

Metisilliiniresistenttien *Staphylococcus pseudintermedius* –kantojen tunnistus ja tyypitys MALDI-TOF MS –menetelmällä

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma

ELK Sanna Aarnio

Helsingin Yliopisto
Eläinlääketieteellinen tiedekunta
Kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto
Eläinlääketieteellinen kliininen diagnostiikka
2017



Tiedekunta - Fakultet - Faculty		Osasto - Avdelning - Department	
Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto	
Tekijä - Författare - Author			
Sanna Aarnio			
Työn nimi - Arbetets titel - Title			
Metisilliiniresistenttien <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> -kantojen tunnistus ja tyypitys MALDI-TOF MS –menetelmällä			
Oppiaine - Läroämne - Subject			
Eläinlääketieteellinen kliininen diagnostiikka			
Työn laji - Arbetets art - Level		Aika - Datum - Month and year	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages
Lisensiaatintyö		17.10.2017	34
<p>Matriisiavusteinen massaspektrometria (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) on molekyylien massa-varaussuhteen mittaamiseen perustuva analyysimenetelmä. MALDI-TOF-massaspektrometriaa käytetään mikrobien lajintunnistukseen, mutta joillain mikrobilajeilla se saattaa soveltua myös lajitasoa tarkempaan analytiikkaan. MALDI-TOF-massaspektrometrian käytöstä <i>Staphylococcus aureuksen</i> metisilliiniresistenssiominaisuuden tunnistuksessa ja epidemiologisessa tyypityksessä on saatu lupaavia tuloksia. <i>Staphylococcus pseudintermediuksella</i> vastaavaa tutkimusta ei ole aiemmin tehty. Tässä työssä selvitettiin MALDI-TOF-massaspektrometrian soveltuvuutta <i>S. pseudintermedius</i> -kantojen metisilliiniresistenssiominaisuuden tunnistukseen ja MRSP (metisilliinille resistenttien <i>S. pseudintermedius</i>) -kantojen epidemiologiseen tyypitykseen.</p> <p>Metisilliiniresistenssiominaisuuden tunnistuksessa tutkittiin 10 MRSP- kantaa ja 10 MSSP (metisilliinille sensitiivistä <i>S. pseudintermedius</i>) -kantaa. MRSP:n epidemiologisessa tyypityksessä tutkittiin 15 MRSP-kantaa, joista kutakin tutkittua klonaalista kompleksia (CC45, CC71 ja CC258) edusti viisi kantaa. Massaspektrit mitattiin Bruker Microflex LT 3.1 -laitteella, ja spektrit käsiteltiin Flex-Analysis 3.4 -ohjelmalla. Erottavia huippuja etsittiin visuaaliseen spektritarkasteluun perustuvan kantakohtaisen huipputaulukoinnin avulla. MRSP-kannoista etsittiin paitsi erottavia huippuja yleisesti, myös kohdennetusti metisilliiniresistenssiominaisuuteen liittyvien PSM-mec- ja MecI-proteiinien massaa vastaavia huippuja. Visuaalisen analyysin lisäksi spektreistä luotiin kantakohtaiset kokoomaspektrit (Main Spectral Profile, MSP), joiden samankaltaisuutta tarkasteltiin FlexAnalysis-ohjelman klusterianalyysillä.</p> <p>MRSP- ja MSSP- kantojen spektrejä ei pystytty erottamaan toisistaan. MecI-proteiinin massaa vastaavia huippuja havaittiin sekä MRSP- että MSSP-kannoilla, ja PSM-mec-proteiinin massaa vastaava huippu havaittiin yhden MRSP-kannan isolaatilla. Klusterianalyysissä MRSP-kannat ryvästyivät sekaisin MSSP-kantojen kanssa.</p> <p>Kaikki klonaaliset MRSP-kompleksit pystyttiin erottamaan toisistaan huippujen 2047 +/-2 m/z ja 4290 +/-3 m/z esiintymisen perusteella. 2047 +/-2 m/z esiintyi kaikilla klonaalisen kompleksin CC258 kannoilla, mutta ei millään muilla kannoilla. 4290 +/-3 m/z esiintyi kaikilla CC71-kannoilla, mutta ei CC45-kannoilla. Eroja havaittiin myös useiden muiden huippujen esiintymisessä. Klusterianalyysissä klonaaliset kompleksit eivät erottuneet toisistaan.</p> <p>Tämän tutkimuksen perusteella MALDI-TOF saattaa soveltua joidenkin klonaalisten MRSP-kompleksien erotteluun, mutta menetelmän käytölle <i>S. pseudintermediuksen</i> metisilliiniresistenssin tunnistamisessa ei saatu puoltavaa näyttöä. Klonaalisten kompleksien erottelussa huippujen poiminta saattaa toimia paremmin kuin klusterianalyysi.</p>			
Avainsanat - Nyckelord - Keywords			
MRSP, <i>S. pseudintermedius</i> , MALDI-TOF MS, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry			
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited			
HELDA – Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktör och ledare - Director and Supervisor(s)			
Johtaja Satu Sankari ja ohjaajat Merja Rantala ja Thomas Grönthal			

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	1
2 STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS	2
2.1. Stafylokokkien metisilliiniresistenssi	3
2.1.1 Stafylokokkien metisilliiniresistenssin mekanismi	4
2.1.2 Stafylokokkien kromosomikasetti mec	5
2.1.3 Metisilliiniresistenssin ilmentymisen säätely	5
2.2 MRSP:n esiintyvyys	6
2.3 MRSP:n epidemiologia	7
2.4 MRSP:n epidemiologiseen tyypitykseen käytettävät menetelmät	8
2.4.1 Monilokusseksenointi	8
2.4.2 Pulssikenttägeelelektroforeesi	8
3 MALDI-TOF	9
3.2 Lajintunnistuksen tarkkuuteen vaikuttavat tekijät	12
3.3 MALDI-TOF S. pseudintermedius-bakteerin tunnistamisessa	13
3.4 MALDI-TOF mikrobien kantatason karakterisoinnissa	14
3.5 MALDI-TOF stafylokokkien metisilliiniresistenssin tunnistamisessa	14
3.5.1 Metisilliiniresistenssiin liittyvä biomarkkeri PSM-mec	16
4 AINEISTO JA MENETELMÄT	17
4.1 Tutkitut bakteerikannat	17
4.2 Näytteiden esikäsittely	17
4.2.1 mecA-ominaisuuden tunnistaminen	17
4.2.2 Epidemiologinen tyypitys	18
4.3 Mittaus ja lajintunnistus	19
4.4 Spektrianalyysi	19
4.4.1 Spektrien esikäsittely	19
4.4.2 Huippujen poiminta ja taulukointi	20
4.4.3 Erottavien huippujen poiminta	21
4.4.4 SCCmec-kompleksiin liittyvien biomarkkerihuippujen tunnistaminen	22

4.4.5 Klusterianalyysi	22
5 TULOKSET	22
5.1 Metisilliiniresistenssiominaisuuden tunnistaminen	22
5.2 Epidemiologinen tyypitys.....	26
6 POHDINTA	28
6.1 Metisilliiniresistenssin tunnistuksen löydösten merkitys	28
6.2 Epidemiologisen tyypityksen löydösten merkitys.....	30
6.3 Huomioita tutkimusasetelmasta.....	31
6.4 Pohdinnan yhteenveto.....	33
7 LÄHTEET	35

1 JOHDANTO

Metisilliiniresistentti *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) on erityisesti koirilla esiintyvä opportunistinen patogeeni, joka on mikrobilääkeresistenssinsä takia noussut lyhyessä ajassa merkittäväksi ongelmaksi eläinlääkinnässä. MRSP aiheuttaa koirille iho-, korva-, virtsatie- ja leikkaushaavatulehduksia, joiden hoito tavanomaisesti käytetyillä mikrobilääkkeillä on hankalaa tai mahdotonta (katsauksessa van Duijkeren ym. 2011b). MRSP on resistentti kaikille beetalaktaamiryhmän antibiooteille (katsauksessa van Duijkeren ym. 2011b) ja usein myös muille mikrobilääkkeille (Perreten ym. 2010). MRSP voi siirtyä eläimistä toisiin eläimiin ja ihmisiin suorassa kontaktissa ja ympäristön välityksellä (van Duijkeren ym. 2011a), ja se on aiheuttanut yhden eläinsairaalaepidemian Suomessa (Grönthal ym. 2014). Riskipotilaiden seulonta ja MRSP-kantojen nopea tunnistaminen ovat avainasemassa epidemioiden ehkäisyssä ja rajoittamisessa.

Metisilliiniresistenssin tunnistamiseen ja MRSP-kantojen epidemiologiseen tyypitykseen sovelletaan useita feno- ja genotyyppiin perustuvia menetelmiä, joista jokaiseen liittyy etuja ja rajoitteita. *mecA*-geenin PCR-monistusta pidetään stafylokokkien metisilliiniresistenssin tunnistamisen kultaisena standardina ja fenotyyppisten menetelmien referenssimenetelmänä. Epidemiologisessa tyypityksessä usein käytettyjä menetelmiä ovat monilokusseksenointi (Multi Locus Sequence Typing, MLST) ja pulssikenttägeelielektroforeesi (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE), joilla saavutetaan hyvä erottelutarkkuus (katsauksessa van Duijkeren ym. 2011b), mutta jotka ovat suhteellisen työläitä menetelmiä. Genotyyppisten menetelmien käyttöä rajoittavat yleisesti niiden laitteisto- ja reagenssivaatimukset, määrittysten hinta ja niihin kuluva työaika.

Matriisiavusteinen massaspektrometria (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) on proteiinien ja peptidien massa-varaussuhteen mittaamiseen perustuva analyysimenetelmä, joka soveltuu useimpien kliinisten bakteerilajien tunnistukseen. MALDI-TOF-laitteen käyttökustannukset ovat vähäiset ja mikrobien lajintunnistuksen tulokset keskimäärin hyvin luotettavia (Seng ym. 2009), mistä johtuen se on syrjäyttänyt fenotyyppisten tunnistusmenetelmien käytön monissa kliinisissä laboratorioissa. MALDI-TOF-massaspektrometrian soveltuvuutta

metisilliiniresistentin *Staphylococcus aureuksen* (MRSA) resistenssiominaisuuden tunnistukseen ja bakteerin epidemiologiseen tyypitykseen on tutkittu paljon (Bernardo ym. 2002, Wolters ym. 2010, Shan ym. 2016), ja tulokset ovat olleet rohkaisevia. Vastaavaa tutkimusta MRSP:n osalta ei kuitenkaan toistaiseksi ole tehty. Tämän tutkimuksen tarkoituksena on selvittää MALDI-TOF MS –menetelmän soveltuvuutta *S. pseudintermediuksen* *mecA*-välitteisen mikrobilääkeresistenssin tunnistukseen ja MRSP-kantojen epidemiologiseen tyypitykseen.

2 STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS

S. pseudintermedius on koirien ja kissojen ihon ja limakalvojen normaalimikrobistoon kuuluva gram-positiivinen kokkibakteeri (Quinn ym. 2011). Se on osa SIG (*Staphylococcus Intermedius Group*) -ryhmää, johon kuuluu *S. pseudintermediuksen* lisäksi kaksi muuta stafylokokkilajia: *S. intermedius* ja *S. delphini* (Sasaki ym. 2007). *S. pseudintermedius* kuvattiin omana lajinaan ensimmäisen kerran vuonna 2005 (Devriese ym. 2005); ennen tätä se oli luettu osaksi *S. intermedius* -lajia. SIG-ryhmän bakteerilajit ovat läheistä sukua toisilleen, ja ne ovat biokemiallisesti hyvin samankaltaisia (Devriese ym. 2005, Sasaki ym. 2007). SIG-ryhmän bakteereista juuri *S. pseudintermedius* assosioituu erittäin voimakkaasti koiraan: Sasaki ym. (2007) tutkimuksessa paljastui, että koirien ihotulehduksista (n=47) ja oireettomilta kantajakoirilta (n=28) eristetyt, fenotyyppisesti *S. intermediuksiksi* tunnistetut isolaatit olivat genotyyppisen testauksen perusteella poikkeuksetta *S. pseudintermedius* -lajia. Devriesen ym. (2009) mukaan kaikkien koirista eristettyjen SIG-ryhmän bakteerilajien voidaankin katsoa olevan *S. pseudintermedius*-lajia, ellei molekulaarisilla menetelmillä toisin todisteta. Ennen vuotta 2005 tehtyihin koirien *S. intermedius* -löydöksiin viitataan kirjallisuudessa usein *S. (pseud)intermedius*-nimellä, ja näin tehdään tässäkin tutkimuksessa.

S. pseudintermedius on muiden stafylokokkilajien tavoin opportunistinen patogeeni, ja se voi aiheuttaa infektioita erityisesti trauman tai immuunipuutoksen seurauksena (Quinn ym. 2011). *S. pseudintermedius* on koirilla ja kissoilla yleinen iho-, korva-, leikkaushaava- ja virtsatietulehdusten aiheuttaja (katsauksessa van Duijkeren ym. 2011b). Kissoilla *S. pseudintermediuksen* kantajuus on vähäisempää kuin koirilla: Lilenbaumin ym. (1998, 1999) tutkimusten mukaan kliinisesti terveistä kissoista 17 % -

20 % kantaa *S. intermedius* -ryhmän lajia, kun koirilla kantajuus on eräässä tutkimuksessa ollut jopa yli 80 % (Rubin ja Chirino-Trejo 2011). *S. pseudintermedius* tavataan myös muilla eläinlajeilla, kuten hevosilla ja papukaijoilla (Devriese ym. 2005), mutta sen merkitys niillä vaikuttaa olevan vähäisempi. *S. pseudintermedius* ja sen metisilliiniresistentti muoto MRSP ovat myös zoonoottisia. Ihmisillä MRSP-kolonisaatio on usein kuitenkin lyhytkestoista, ja infektiota raportoidaan suhteellisen harvoin (katsauksessa Weese ja van Duijkeren 2010). Poikkeus tästä ovat koiran puremat ihmisillä: niissä *S. (pseud)intermedius* oli erään tutkimuksen mukaan infektion aiheuttajana jopa 18 % tapauksista (Lee ym. 1994).

S. pseudintermedius -bakteerilla on useita virulenssitekijöitä, jotka edistävät sen kolonisaatiota ja aiheuttavat kudostuhoa isäntäeläimessä. Merkittäviä virulenssitekijöitä ovat muun muassa termonukleaasi, leukosidiinit ja hemolysiinit sekä erilaiset eksfoliatiiviset toksiinit (katsauksessa van Duijkeren ym. 2011b, Quinn ym. 2011). Eksfoliatiiviset toksiinit vaurioittavat solujen välisiä liitosproteiineja (desmogleiineja) aiheuttaen klassisia bakteriellin ihotulehduksen oireita: punoitusta, hilseilyä ja ruvenmuodostusta (Terauchi ym. 2003). *S. pseudintermedius* pystyy myös muodostamaan biofilmejä, mikä edesauttaa sen kiinnittymistä sileiden materiaalien pintoihin ja tekee sen hävittämisestä hankalampaa. Biofilmin muodostus lisää mahdollisuutta ortopedisessä kirurgiassa käytettävien implanttimateriaalien kolonisaatioon ja niiden välittämään krooniseen bakteeritulehdukseen (Quinn ym. 2011).

2.1. Stafylokokkien metisilliiniresistenssi

Metisilliiniresistenssiä tavataan *S. pseudintermediuksen* lisäksi *S. aureuksessa* ja useissa koagulaasinegatiivisissa stafylokokkilajeissa (KNS) (katsauksessa Peacock ja Paterson 2015). Metisilliiniresistentit stafylokokit ovat viidennen polven kefalosporiineja lukuun ottamatta vastustuskykyisiä kaikille beetalaktaamiryhmän mikrobilääkkeille (Papich ym. 2012). Viidennen polven kefalosporiineja käytetään ihmisillä metisilliiniresistenttien bakteerien aiheuttamien infektioiden hoitoon (Hughes 2017), mutta niiden käyttäminen eläinten lääkintään ei ole sallittua Suomessa (Lääkekieltoasetus 847/2008 11§).

MRSP-kannoista suurin osa on beetalaktaamien lisäksi resistenttejä myös yhdelle tai useammalle eri mikrobilääkeryhmien lääkeaineille (katsauksessa van Duijkeren ym.

2011b). Moniresistentteihin MRSP-kantoihin voivat tehot vain harvat tai eivät mitkään käytettävissä olevista mikrobilääkkeistä, minkä vuoksi niiden aiheuttamia infektioita voi olla hankala tai mahdoton hoitaa. Dos Santosin ym. (2016) systemaattisen katsauksen aineistossa yli 90 % MRSP-kannoista oli resistenttejä erytromysiinille ja klindamysiinille ja yli 70 % tetrasykliinille, trimetopriimi/sulfametoksatsolille, enrofloksasiinille ja gentamisiinille. Myös kloramfenikoliresistenssia tavattiin yli 40 %: lla kannoista (katsauksessa dos Santos ym 2016).

2.1.1 Stafylokokkien metisilliiniresistenssin mekanismi

S. pseudintermediuksen metisilliiniresistenssi on Staphylococcal Chromosomal Cassette *mec* (SCC*mec*)-kompleksiin kuuluvan *mecA*-geenin välittämä ominaisuus (katsauksessa van Duijkeren ym. 2011b). *mecA*-geeni koodaa muuntunutta penisilliiniä sitovaa proteiinia (eng. *Penicillin Binding Protein*), PBP2a:a, (katsauksessa Turlej ym. 2011), joka toimii bakteerin solukalvosynteesiin tarvittavien reaktioiden katalyyttinä (katsauksessa Sauvage ym. 2008). Stafylokokit tuottavat sisäsyntyisesti useita erilaisia PBP-proteiineja, joista ainakin osa on niiden toiminnalle välttämättömiä (katsauksessa Bycroft ja Shute 1985).

Beetalaktaamien bakterisidinen vaikutus perustuu PBP-proteiinien inaktivaatioon. Villityypin PBP-proteiineilla on korkea affiniteetti beetalaktaameille, koska niiden luontaisilla substraattimolekyyleillä, peptidoglykaaneilla, on beetalaktaamia muistuttava molekyyli rakenne. Beetalaktaamin ja PBP-proteiinin reaktiossa PBP-proteiinin normaali toiminta estyy (katsauksessa Bycroft ja Shute 1985), mikä voi entsyymien tyypistä riippuen johtaa solun turpoamiseen tai hajoamiseen (Georgopapadakou ym. 1986) tai estää solun jakautumisen (katsauksessa Bycroft ja Shute 1985).

Villityypin PBP-proteiineista poiketen PBP2a-proteiineilla on heikko affiniteetti beetalaktaameihin (Hartman & Tomasz 1984). Beetalaktaamien aiheuttama inaktivaatio on PBP2a-proteiineilla hidasta ja tehotonta (Fuda ym. 2004), mistä syystä ne pystyvät jatkamaan toimintaansa sellaisissakin beetalaktaamipitoisuuksissa, jotka ovat villityypin proteiineille estäviä. PBP2a pystyy korvaamaan inaktivoituneiden villityypin PBP-proteiinien toiminnan (Hartman & Tomasz 1984), mikä tekee sitä tuottavista bakteereista vastustuskykyisiä beetalaktaamiryhmän mikrobilääkkeille.

2.1.2 Stafylokokkien kromosomikasetti *mec*

SCC*mec* kantaa metisilliresistenssiä välittävää *mecA*- tai *mecC*-geeniä ja sen ilmentämiseen liittyviä *mec*-ryhmän säätelyproteiineja koodaavia geenejä. Lisäksi se kantaa oman liikkumisensa mahdollistavan rekombinaasikompleksin (engl. *cassette chromosome recombinase*, *ccr*) ja *joining regions* tai *junkyard (j)*-alueen, joka saattaa kannasta riippuen sisältää erilaisia antibiootti- ja raskasmetalliresistenssigeenejä (katsauksessa Peacock ja Paterson ym. 2015). Toisin kuin *S. aureuksella*, *S. pseudintermediuksella* ei ole toistaiseksi tavattu *mecA*-geenin homologin, *mecC*-geenin välittämää metisilliiniresistenssiä. SCC*mec* voi siirtyä bakteerisolusta toiseen horisontaalisella geeninsiirrolla ja levittää metisilliiniresistenssiä uusiin stafylokokkikantoihin (katsauksessa Peacock ja Paterson 2015). Nykykäsityksen mukaan koagulaasinegatiiviset stafylokokit saattavat toimia SCC*mec*-elementtien reservoaarina virulentimmille stafylokokkilajeille, kuten *S. aureukselle* (Hanssen ja Sollid 2007, Barbier ym. 2010) ja mahdollisesti myös *S. pseudintermediukselle*.

MRSP-kannoilla on tavattu kuutta eri SCC*mec*-tyyppiä (II, II-III, IV, V, VII ja yhdistelmätyyppi SCC*mec*AI16-SCC*czr*AI16-CI) (katsauksessa dos Santos ym. 2016, Grönthal ym. 2017). Lisäksi niillä tavataan kuvattujen tyyppitysmenetelmien ulkopuolelle jääviä SCC*mec*-tyyppejä (katsauksessa van Duijkeren 2011, Grönthal ym. 2017b) sekä pseudoSCC*mec*-elementtejä, kuten ψ SCC*mec*57395, joka ei sisällä lainkaan rekombinaasigeenejä (Perreten ym. 2013). Suomessa *S. pseudintermedius* -kannoissa tavattavista, kuvatuilla menetelmillä tyyppitettävissä olevista SCC*mec*-tyypeistä yleisimmät ovat IV ja II-III (Grönthal ym. 2017b).

2.1.3 Metisilliiniresistenssin ilmentymisen säätely

mecA-geenin ilmentymistä säätelevät SCC*mec*-elementtiin kuuluvat *mecR1*-, *mecR2*- ja *mecI*-geenit. *mecI* koodaa repressoriproteiinia, joka estää *mecA*-geenin ja sen säätelytekijöiden transkription (Blázquez ym. 2014, katsauksessa Peacock ja Paterson 2015). MecR1- ja MecR2-proteiinit toimivat repressorin vastavaikuttajina: niiden aktivaatio johtaa repressoriproteiinien inaktivoitumiseen, mikä mahdollistaa *mecA*-geenin transkription (Arêde ym. 2012, katsauksessa Peacock ja Paterson 2015) ja metisilliiniresistenssin ilmentymisen.

MecR1-proteiinilla on solunulkoinen, sensorinen osa, joka aktivoituu reagoidessaan ympäristön beetalaktaamien kanssa. Aktivaation seurauksena proteiinin solunsisäinen osa irtaantuu ja aiheuttaa DNA:han sitoutuneen MecI-repressoriproteiinin pilkkoutumisen. MecR1-välitteinen *mecA*-geenin transkription induktio mahdollistaa resistenssifenotyyppien kohdentamisen niihin tilanteisiin, joissa bakteerin ympäristössä on beetalaktaamimolekyylejä, ja resistenssin ilmentäminen on selviämisen kannalta välttämätöntä (katsauksessa Peacock ja Paterson 2015). MecR1-välitteistä resistenssin induktiota pidetään yksinään kuitenkin melko hitaana ja tehottomana, ja korkean resistenssin MRSA-kannoilla resistenssin induktioon osallistuu tyypillisesti muitakin positiivisia säätelytekijöitä (Ryffel ym. 1992).

MecR2-proteiinin aktivaatio aiheuttaa MecR1-proteiinin tavoin transkriptiota inhiboivan MecI-proteiinin pilkkoutumisen (Arêde ym. 2012). Arêde ym. (2012) havaitsivat, että *mecR2*-deleetiomutanttien *S. aureus* -kantojen metisilliiniresistenssi on matala-asteisempaa kuin niillä kannoilla, joilla geeni on toimiva. Vastaavasti *mecR2*-geenin transduktio näihin kantoihin palautti niiden metisilliiniresistenssin takaisin alkuperäiselle, korkeammalle tasolle (Arêde ym. 2013). *mecR2*-geeniä ilmennetään yhdessä muiden *mec*-kompleksiin kuuluvien säätelytekijöiden kanssa, mutta sen aktivaatioon johtavia tekijöitä ei toistaiseksi tunneta (katsauksessa Peacock ja Paterson 2015).

2.2 MRSP:n esiintyvyys

MRSP eristettiin ensimmäisen kerran Yhdysvalloissa vuonna 1999 (Gortel ym. 1999) ja Euroopassa vuonna 2005 (Loeffler ym. 2007). Nykyään sitä tavataan yleisesti lukuisissa Euroopan, Pohjois-Amerikan (Perreten ym. 2010) ja Aasian maissa (Kawakami ym. 2010). Metisilliiniresistenttien kantojen esiintyvyys *S. pseudintermedius* -populaatiossa vaihtelee huomattavasti eri tutkimuksissa. Osan eroista selittää todellinen maiden välinen vaihtelu, mutta myös aineiston keräämisen vuosi, tutkittu populaatio ja tutkimusmenetelmät vaikuttavat tuloksiin. Keski- ja Etelä-Euroopan maissa MRSP:n esiintyvyydeksi *S. pseudintermedius* -populaatiossa on raportoitu 8-21 %, kun Kiinassa se on ollut jopa 48 % (Grönthal 2017a). Suomessa MRSP:n esiintyvyys oli 14 % vuosina 2011 – 2015 (Grönthal ym. 2017).

MRSP voi MSSP:n (metisilliinisensitiivinen *S. pseudintermedius*) tavoin kolonisoida terveitä eläimiä, ja kantajat voivat levittää resistenttejä kantoja muihin eläimiin ja ihmisiin (katsauksessa Weese ja van Duijkeren 2010, van Duijkeren 2011a). Riskiryhmään kuuluvilla eläimillä (ihotulehduksista kärsivät, useita antibioottikuureja saaneet) MRSP-kantajuus on yleisempää kuin terveillä eläimillä: suomalaisen opaskoirakoulun koirilla MRSP-kantajuuden esiintyvyys oli 3 % vuonna 2014 (Grönthal ym. 2015), kun se on riskiryhmien seulonnassa ollut lähes 10 % (Grönthal ym. 2015). Suomessa on kuvattu yksi MRSP:n aiheuttama eläinsairaalaepidemia vuosina 2010 – 2012. Epidemian aikana yhteensä 70 potilaan todettiin infektoituneen tai kolonisoituneen tietyllä moniresistentillä MRSP ST71 -kannalla (Grönthal ym. 2014).

2.3 MRSP:n epidemiologia

MRSP-populaatioiden epidemiologisessa tutkimuksessa käytetään usein monilokussekvensointia (MLST) (menetelmän kuvaus kappaleessa 2.4.1), jolla määritetään kannan sekvenssityyppi (engl. *Sequence Type*, ST) ja kyseisen sekvenssityypin klonaalinen kompleksi (engl. *Clonal Complex*, CC). Samaan klonaaliseen kompleksiin kuuluvat kannat ovat geneettisesti hyvin samankaltaisia, eli keskenään läheistä sukua. Lajeilla, joilla on klonaalinen populaatiojakauma, tavataan runsaasti samaan sekvenssityyppiin tai klonaaliseen kompleksiin kuuluvia kantoja laajoilla alueilla ja pitkän ajan kuluessa.

MRSP-populaatiossa tunnetaan viisi poikkeuksellisen laajalle levinnyttä klonaalista kompleksia: CC45, CC71, CC258, CC68 ja CC112. Näiden ja useiden pienempien klonaalisten kompleksien lisäksi MRSP-populaatioon kuuluu suuri joukko ei-klonaalisia kantoja (ns. taustakantoja). MRSP:n populaatiorakenne on tämän vuoksi enemmän epideeminen kuin klonaalinen: heikosti klonalisesta populaatiosta eriytyy yksittäisiä menestyksekkäitä (=epideemisiä) kantoja (katsauksessa dos Santos ym. 2016).

Vuonna 2010 yleisimmät Suomessa tavattavat klonaaliset kompleksit olivat CC71 ja CC45. CC71:n osuus MRSP-kannoista on viime vuosien aikana kuitenkin laskenut: vuonna 2010 sen osuus kaikista MRSP-kannoista oli noin 50 %, ja vuonna 2014 enää noin 10 %. CC71:n tilalle on tullut useita pienempiä klonaalisia komplekseja ja suuri joukko sekalaisia sekvenssityyppejä (Grönthal ym. 2017b). Samankaltaisia muutoksia MRSP:n

populaatorakenteessa on viime vuosina raportoitu muun muassa Norjasta (Kjellman ym. 2015) ja Alankomaista (Duim ym. 2016).

2.4 MRSP:n epidemiologiseen tyypitykseen käytettävät menetelmät

MRSP:n epidemiologisessa tyypityksessä usein käytettyjä menetelmiä ovat pulssikenttägeelielektroforeesi (engl. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, PFGE) ja monilokussekvensointi (*Multi Locus Sequence Typing*, MLST). Menetelmät kuvataan alla pääpiirteissään. Muita *S. pseudintermediuksen* tyypitykseen käytettäviä menetelmiä ovat SCCmec-tyypitys (Grönthal 2017a) ja koko genomin sekvensointi (Windahl ym. 2016). Niitä ei kuitenkaan käsitellä tässä kirjallisuuskatsauksessa.

2.4.1 Monilokussekvensointi

Monilokussekvensointi perustuu ns. housekeeping-geenien eli mikrobien perusaineenvaihdunnasta vastaavien geenien sekvenssivariaatioiden tunnistamiseen. Housekeeping-geenit soveltuvat pitkäaikaiseen epidemiologiseen seurantaan, koska niiden mutaatiofrekvenssi on suhteellisen matala. Toisaalta tämän vuoksi niillä ei yleensä saavuteta riittävää erottelutarkkuutta hyvin läheisten kantojen erotteluun (esimerkiksi epidemiatilanteissa) (Cooper ja Feil 2004). Housekeeping-geenejä sekvensoidaan tyypillisesti 500 – 550 emäsparin pituinen pätkä, ja saatuja sekvenssejä verrataan viitetietokantaan. Jokaiselle tietyssä lokuksessa aiemmin kuvaamattomalle sekvenssille annetaan oma luku, ja kaikkien lokusten lukujen yhdistelmän perusteella määritellään kannan sekvenssityyppi. *S. pseudintermediuksella* tunnetaan useita satoja sekvenssityyppejä, ja uusia sekvenssityyppejä löydetään jatkuvasti. Keskenään samankaltaisten (esimerkiksi single- tai double locus -variaatioiden) sekvenssityyppien määritellään usein kuuluvan samaan klonaaliseen kompleksiin (CC), mutta pitävää määritelmää siitä, kuinka paljon variaatiota *S. pseudintermediuksen* klonaalisen kompleksin sisällä sallitaan, ei ole vielä annettu (PubMLST 2017). *S. pseudintermediuksen* MLST-tyypityksessä sekvensoidaan yleensä seitsemän eri lokusta (Solyman ym. 2013).

2.4.2 Pulssikenttägeelielektroforeesi

Pulssikenttägeelielektroforeesi- eli PFGE-tyypityksessä mikrobikannat erotellaan niiden DNA:sta muodostetun restriktiokuvion perusteella. Mikrobit asetetaan geeliblokkiin,

jossa niiden soluseinäjä hajotetaan ja DNA pilkotaan harvaan pilkkovalla restriktioentsyymillä. Jokaisella restriktioentsyymillä on sille ominainen restriktiokohta eli tietty emäsjärjestys, jonka kohdalta se katkaisee DNA-juosteen. Entsyymien tuottamat DNA-fragmentit puhdistetaan solujätteestä, minkä jälkeen ne erotellaan geelin sisällä kokonsa mukaiseen järjestykseen suuntaa vaihtavan sähkökentän avulla. Ajon loputtua fragmenttien muodostama viivakuviokuva (=restriktiokuva) tehdään näkyväksi värjäämällä DNA ja kuvaamalla koko geeli UV-valossa (Quinn ym. 2011, Grönthal 2017a).

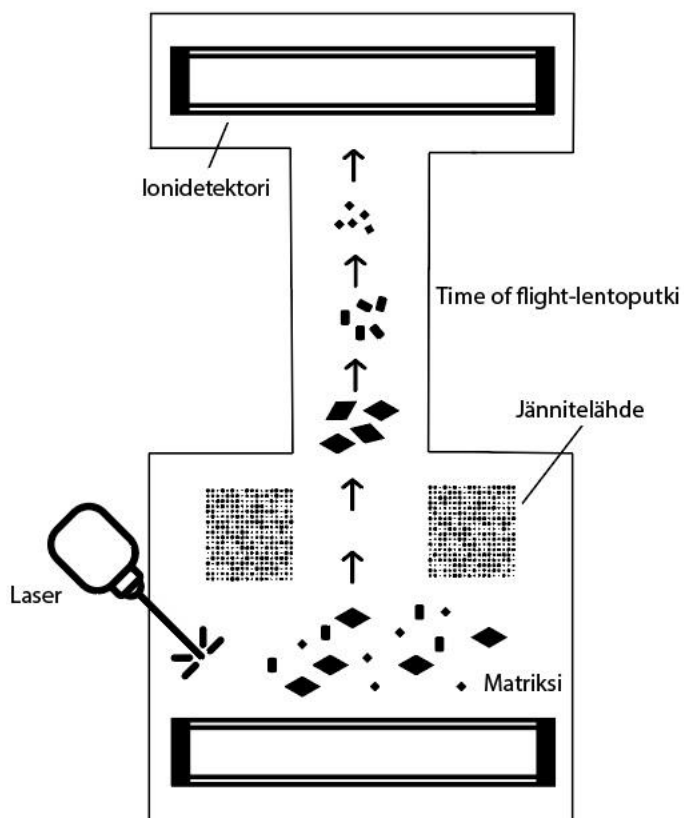
DNA:n pilkkomiseen käytettävien entsyymien restriktiokohdissa tapahtuvat mutaatiot muuttavat DNA:sta muodostuvien fragmenttien määrää ja pituutta, mikä puolestaan muuttaa kannasta muodostuvaa restriktiokuvioita. Esimerkiksi yhden restriktiokohdan mutatoituminen toimimattomaksi hävittää alkuperäisestä kannasta kaksi pienempää DNA-fragmenttia ja tuottaa yhden uuden, suuremman DNA-fragmentin (Tenover ym. 1995). PFGE on tyyppitysmenetelmänä melko hidas (yksi ajo kestää joitain päiviä) (Herschleb ym. 2007), mutta sillä on hyvä erottelutarkkuus ja se on laboratorioden välillä hyvin toistettava menetelmä (Quinn ym. 2011). Se soveltuu parhaiten pienten näytemäärien analysointiin esimerkiksi epäillyissä epidemiatilanteissa (Tenover ym. 1995).

3 MALDI-TOF

MALDI-TOF MS eli Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry on massaspektrometriaan perustuva analyysimenetelmä, jota käytetään kliinisessä mikrobiologiassa bakteerien lajinmääritykseen ja bakteerikantojen karakterisointiin (katsauksessa Awad ym. 2014, Šedo ja Zdráhal 2016). Lajinmääritys perustuu bakteerin molekyylimassaspektriin, joka pystytään viitetietokannan avulla yhdistämään tiettyyn bakteerilajiin ja joissain tapauksissa myös tiettyyn bakteerikantaan (Šedo ja Zdráhal 2016). Näytteenä käytetään viljelyalustalta eristettyjä kokonaisia bakteerisoluja tai bakteerisolusta valmistettua proteiinisuspensiota (Nomura 2015). Tarvittava näytemäärä saadaan usein jo primaariviljelmästä tai rikasteliemestä, ja lajintunnistus on monien lajien kohdalla mahdollista tehdä muutamissa minuuteissa (Seng ym. 2009). MALDI-TOF-laitteet ovat helppokäyttöisiä ja pitkälle automatisoituja,

ja niiden käyttökustannukset ovat moniin biokemiallisiin testeihin verrattuna melko pienet (Seng ym. 2009). Tietyt MALDI-TOF-laitteistot ja niihin liittyvät viitetietokannat on hyväksytty diagnostiseen lääketieteelliseen käyttöön Euroopan Unionissa vuonna 2009 (Bruker 2017a) ja Yhdysvalloissa vuonna 2013 (Bruker 2017b, bioMérieux 2017).

Massaspektrometrissä on kaksi perusosaa: ionilähde ja massatunnistin. Perusosien ominaisuudet määrittävät, millaisia näytteitä laitteilla voidaan analysoida ja millaista tietoa näytteistä voidaan kerätä. Kokonaisten proteiinien analysoinnissa käytetään pääasiassa MALDI- tai ESI (Electron Spray Ionization) -ionilähteen omaavia massaspektrometrejä (Basile ja Mignon 2016). Tässä kirjallisuuskatsauksessa käsitellään MALDI-ionilähteen erityispiirteitä ja MALDI-TOF-massaspektrometrian sovelluksia kliinisessä bakteriologiassa siinä laajuudessa, kun tutkielman kannalta on oleellista. MALDI-TOF-laitteen kaavakuva esitetään kuvassa 1.

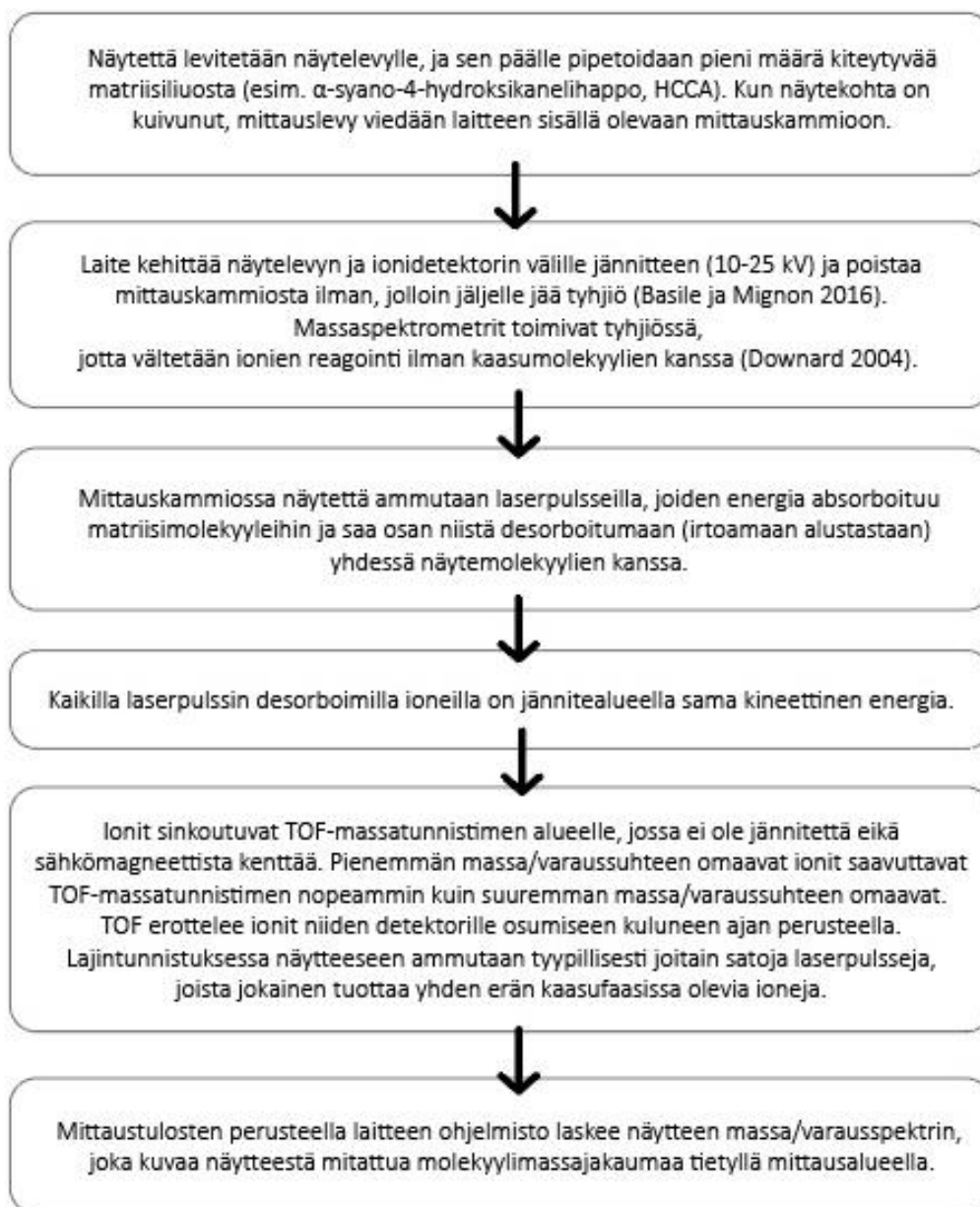


Kuva 1. Kaavakuva MALDI-TOF-laitteesta. Alhaalla on näytelevy, jossa on matriisiin hautautunutta näyttemateriaalia. Näytelevyllä olevaa näytettä ammutaan lasersäteillä, mikä saa matriisi- ja näytemolekyylejä irtoamaan alustastaan ja siirtymään kaasufaasiin. Kaasufaasissa olevat ionit sinkoavat jännitelähteen tuottaman sähkökentän vaikutuksesta lentoputkeen, minkä jälkeen ne tunnistetaan ionidetektorilla.

Massaspektrometriassa ionilähteen tehtävä on ionisoida näytemolekyyliä ja saattaa niitä kaasufaasiin massa-analyysiä varten (Basile ja Mignon 2016). MALDI-ionisaatiossa näytteeseen lisätään matriisiliuosta, joka liuottaa näytteenä olevien bakteerisolujen soluseinämärakenteita ja aiheuttaa bakteerin soluliman molekyylien ionisaatiota (Ryzhov ja Fenselau 2001). Matriisiliuos sisältää happoa (esimerkiksi kaneli- tai sinappihappoa) ja orgaanista liuotinta, minkä vuoksi se ionisoi ensisijaisesti emäksisiä (Krause ym. 1999) ja lievästi hydrofiilisiä molekyyliä (Ryzhov ja Fenselau 2001). MALDI-ionisaatio tuottaa pääasiassa yhdenarvoisia, positiivisesti varautuneita ioneja, ja toisin kuin monet muut ionisaatiomenetelmät, se mahdollistaa suurikokoisten molekyylien, kuten kokonaisten proteiinien, ionisaation (Basile ja Mignon 2016).

Massa-analyysi on mahdollista tehdä vain kaasufaasissa oleville molekyylielle. MALDI-ionilähteessä näytemolekyylien kaasuuntuminen tapahtuu laservälitteisen desorption avulla (Basile ja Mignon 2016). Desorption tapahtuu massaspektrometrin sisällä, jossa näyte-matriisiseosta ammutaan lasersädepulsseilla: säteiden sähkömagneettinen energia absorboituu matriisimolekyyliin lisäten niiden lämpö- ja translationaalista energiaa, mikä saa osan matriisimolekyyleistä irtoamaan alustastaan (Haglund 1997). Samalla irtoaa myös matriisiin hautautuneita näytemolekyyliä. Ionisaation tarkkaa mekaniikkaa MALDI-ionisaatiossa ei tunneta: ionisaatiota tapahtunee paitsi näytteen ja matriisin ollessa vielä nestemäisessä muodossa, myös niiden ollessa jo kaasufaasissa (Basile ja Mignon 2016). Kaaviossa 1. esitetään MALDI-TOF-laitteen käyttö ja toiminta pääpiirteissään.

Lajintunnistuksessa mitattava molekyylimassaväli kattaa vain pienen osan bakteerin koko proteomista (sen tiettyinä hetkenä tuottamasta proteiinijoukosta): esimerkiksi *E. coli* -bakteerilla 2,8 % laskennallisesti tuotetuista proteiineista sijoittuu tyypillisesti mitattavalle 2000 – 20 000 Da massa-alueelle (Basile ja Mignon 2016).



Kaavio 1. MALDI-TOF-laitteen käyttö ja toimintaperiaate.

3.2 Lajintunnistuksen tarkkuuteen vaikuttavat tekijät

Kliinisessä mikrobiologiassa mikrobista mitatun molekyylimassaspektrin huippuja ei yleensä yksilöidä, vaan spektri toimii viivakoodin kaltaisena tunnisteena; englanniksi puhutaan *molecular fingerprintistä* eli molekulaarisesta sormenjäljestä, ja tämän perusteella tehtävää lajintunnistusta kutsutaan profiiliin perustuvaksi tunnistukseksi (engl. *profile-based identification*) (Josten ym. 2014, Basile ja Mignon 2016). Profiiliin perustuvan tunnistuksen onnistuminen ja tarkkuus riippuvat käytetyn viitetietokannan kattavuudesta. Veloo ym. (2016) havaitsivat, että eräiden anaerobisten

kokkibakteerilajien massaspektreissä esiintyy tunnistuksen kannalta merkittävää kantojen välistä vaihtelua, ja että eri kannoista mitattujen massaspektrien lisääminen viitetietokantaan parantaa tunnistustulosta. Sengin ym. (2009) tekemässä laajassa, 1660 kliinistä bakteerikantaa ja 109 bakteerilajia kattavassa tutkimuksessa havaittiin, että kymmenen tai enemmän samasta lajista mitattua viitespekttriä korreloi oikean ja tarkan tunnistustuloksen kanssa ($p=0,01$), kun taas puutteellisen tai virheellisen viitetietokannan on monissa tutkimuksissa havaittu johtavan heikkoihin tai virheellisiin tunnistustuloksiin (Seng ym. 2009, Decristophoris ym. 2011, van Veen ym. 2010, Paauw ym. 2015). MALDI-TOF-menetelmällä on mahdollista tunnistaa useilla eri elatusaineilla kasvatettuja mikrobeja (Valentine ym. 2005), mutta tunnistuksen keskimääräinen tarkkuus (laji- vs. sukutasolle) saattaa joidenkin mikrobilajien kohdalla olla tietyillä elatusaineilla heikompi (Anderson ym. 2012).

Viitetietokannan ja elatusaineen lisäksi myös muiden muuttujien, kuten näytteen esikäsittelyn (Alatoom ym. 2011, Park ym. 2016), mikrobien kasvatusajan (Šedo ym. 2013) sekä mikrobien luontaisten ominaisuuksien, kuten soluseinän rakenteen ja paksuuden (Park ym. 2016) tiedetään vaikuttavan tunnistuksen onnistumiseen. Hyvän tunnistustuloksen takaamiseksi viitetietokantaan lisättävien massaspektrien tulee olla peräisin kontrolloiduissa olosuhteissa kasvatetuista, hyvin karakterisoiduista ja tietyllä tavalla esikäsitellyistä mikrobikannoista. Näytteen esikäsittelyssä tulisi ottaa huomioon bakteerilajien erityispiirteet.

3.3 MALDI-TOF *S. pseudintermedius*-bakteerin tunnistamisessa

MALDI-TOF-menetelmän tunnistustarkkuus *S. pseudintermedius*-bakteerille on Decristophorisin ym. (2011) tutkimuksessa havaittu melko hyväksi (sensitiivisyys 78 % (95 % CI 0,60 – 0,90) ja spesifisyys 97 % (95 % CI 0,86 – 99)). Murugaiyanin ym. (2014) tutkimuksessa *S. pseudintermediuksen* tunnistustulos parani, kun viitetietokantaan lisättiin hyvin karakterisoitujen SIG-ryhmän kantojen spektrejä. Ilman viitetietokannan täydentämistä lajitason tunnistuksessa on saatu heikompia tuloksia: usein toistuva virhe on ollut *S. pseudintermediuksen* sekoittuminen *S. intermediuksen* kanssa (Murugaiyan ym. 2014, Silva ym. 2015).

3.4 MALDI-TOF mikrobien kantatason karakterisoinnissa

MALDI-TOF-massaspektrometria on mikrobien lajintunnistuksessa jo vakiintunut menetelmä, mutta kantatason karakterisoinnissa sen mahdollisuuksia ja rajoitteita ei tunneta yhtä hyvin. Menetelmän soveltuvuudesta eri mikrobilajien alalaji-, serotyyppi- tai biotyyppitason erotteluun ja muuhun lajitasoa tarkempaan analytiikkaan on julkaistu lukuisia tutkimuksia (katsauksessa Sandrin ym. 2013), mutta yleistettäviä johtopäätöksiä sillä saavutettavasta taksonomisesta resoluutiosta ei ole vielä voitu vetää. Tutkimusten vertailua ja tulosten yhteenvedoa hankaloittaa se, että tutkimusmenetelmät vaihtelevat paljon, eikä mittaustiedon tulkintaan ei ole olemassa vakiintuneita kriteerejä (Spinali ym. 2015).

Kantatason karakterisoinnissa mikrobien kasvatusolosuhteilla ja näytteen esikäsittelyyn käytetyillä menetelmillä on analyysin onnistumisen kannalta suurempi merkitys kuin lajintunnistuksessa (Šedo ja Zdráhal 2016). Šedon ym. (2011) katsausartikkelissa käsitellään erilaisten esikäsittelymenetelmien vaikutusta MALDI-TOF-spektrin laatuun; esimerkiksi erilaisten liuotusprotokollien, ultraäänikäsittelyn, magneettisten helmien, entsyymaattisen hajotuksen ja erilaisten matriisiliuosten vaikutuksia on tutkittu. Tietyillä esikäsittelymenetelmillä voidaan parantaa spektrin signaali-melu-suhdetta (Liu ym. 2007) tai vaikuttaa mitattavien huippujen lukumäärään (Ryzhov ym. 2000, Dieckmann ym. 2008). Monimutkaisten esikäsittelymenetelmien kääntöpuolena on, että ne lisäävät työ määrää, eivätkä välttämättä sellaisenaan sovellu kliiniseen diagnostiikkaan.

3.5 MALDI-TOF stafylokokkien metisilliiniresistenssin tunnistamisessa

Tutkimuksia *S. pseudintermediuksen* metisilliiniresistenssin tunnistuksesta MALDI-TOF-menetelmällä ei tietääkseni ole julkaistu, joten käsittelen tässä kirjallisuuskatsauksessa *S. aureksella* tehtyjä tutkimuksia. PSM-*mec* (Phenol Soluble Modulin *mec*) -peptidin tunnistukseen perustuvaa metisilliiniresistenssin tunnistusta käsitellään tarkemmin kappaleessa 3.5.1.

Yhden ensimmäisistä MRSA- ja MSSA (metisilliinille sensitivinen *S. aureus*) -kantojen erottelua käsittelevistä tutkimuksista tekivät Edwards-Jones ym. vuonna 2000. Tutkimuksessa verrattiin seitsemän MRSA- ja MSSA-kannan spektrejä silmämääräisesti

toisiinsa ja havaittiin, että MRSA-kannat muodostivat kategorisesti suuremman määrän huippuja kuin MSSA-kannat. Lisäksi viiden huipun (m/z 891, 1140, 1165, 1229 ja 2127) havaittiin esiintyvän kaikkien MRSA-kantojen spektreissä, mutta ei yhdenkään MSSA-kannan spektrissä. Tulokset vaikuttivat lupaavilta, mutta myöhemmissä tutkimuksissa niitä ei ole pystytty toistamaan. MRSA- ja MSSA-kantoja erottavia huippuja ovat myöhemmin tuloksetta etsineet ainakin Bernardo ym. (2002), Szabados ym. (2012) ja Lasch ym. (2014).

Szabados ym. (2012) vertasivat isogeenisten (SCC*mec*-elementti oli ainoa kantoja geneettisesti erottava tekijä) MRSA- ja MSSA-kantojen spektrejä toisiinsa ja havaitsivat, että spektrit olivat lähes identtiset. Tutkijat huomauttivat, että tämän tuloksen perusteella ei kuitenkaan voida mitätöidä aiempien tutkimusten havaintoja MRSA- ja MSSA-kantoja erottavista huipuista, sillä erilaiset instrumentit ja mittaasetukset, erilainen massaväli sekä matriisiliuoksen tyyppi voivat vaikuttaa spektrissä esiintyviin huippuihin. He kuitenkin osoittivat, että Edwards-Jones ym. (2000), Du ym. (2002), Shah ym. (2011), Majcherczyk ym. (2006) ja Sun ym. (2011) olivat aiemmissä tutkimuksissaan ehdottaneet MRSA-kantoja erottaviksi huipuiksi pääasiallisesti eri huippuja, vaikka mitattu massaväli olisi ollut sama.

Böhme ym. (2012) ja Walker ym. (2002) käyttivät klusterianalyysiä MRSA- ja MSSA-kantojen erotteluun. Walkerin ym. (2002) tutkimuksessa epideemiset MRSA-kloonit erottuivat MSSA-kannoista, mutta epideemisten kloonien ulkopuolelle jäivät kannat ryvästyivät sekaisin MSSA-kantojen kanssa. Vastaavaan tulokseen päädyttiin Böhmen ym. (2012) tutkimuksessa, jossa käsiteltiin toksikogeenisten *S. aureus*-kantojen erottelua, mutta joukossa mukana olevien MRSA-kantojen havaittiin myös tässä tutkimuksessa sekoittuvan MSSA-kantojen kanssa. Dun ym. (2002) klusterianalyysissä sen sijaan saavutettiin melko selkeä jakolinja: 76 MRSA-kannasta 69 erottui MSSA-kannoista. MRSA-klusteriin sijoittui seitsemän *mecA*-negatiivista *S. aureus*-kanta, joista kaksi oli yllättäen fenotyyppisesti metisilliiniresistenttejä.

Erilaista lähestymistapaa käytettiin Shanin ym. (2016) tutkimuksessa, jossa MRSA-kantoja tunnistettiin profiiliperusteisesti (näytteen spektri-profiilia verrattiin viitetietokannan spektri-profiileihin). Laatiemiensa MRSA-viitespektrien avulla tutkijat onnistuivat tunnistamaan oikein 84 % tutkimistaan MRSA-kannoista. Joidenkin kantojen

tunnistus oli kuitenkin virheellinen – 13 % MRSA-kannoista luokiteltiin virheellisesti MSSA-kannoiksi, ja 7 % MSSA-kannoista luokiteltiin virheellisesti MRSA-kannoiksi.

MRSA- ja MSSA-kantojen kantakohtainen variaatio saattaa selittää osan aiemmissa tutkimuksissa havaituista MRSA-kantoja erottavista huipuista (Szabados ym. 2012). Kantakohtaisen variaation tunnistusta voitaisiin soveltaa metisilliiniresistenssin tunnistamiseen sellaisissa tilanteissa, joissa kaikkien tiettyyn klonaaliseen kompleksiin kuuluvien *S. pseudintermedius* -kantojen tiedetään olevan metisilliiniresistenttejä (Kostrzewa ym. 2013). Dos Santosin ym. (2016) systemaattisen katsauksen perusteella tällainen klonaalinen kompleksi voisi olla esimerkiksi CC71. Ottaen huomioon, että suuri osa Euroopassa ja Suomessa tavattavista MRSP-kannoista kuuluu tähän klonaaliseen kompleksiin (katsauksessa dos Santos ym. 2016, Grönthal 2017a), ja että *S. aureus* -kantojen klonaalisten kompleksien tunnistamisesta MALDI-TOF-menetelmällä on jo vahvaa näyttöä (Josten ym. 2013, Østergaard ym. 2015, Camoez ym. 2016), voisi tämä olla varteenotettava vaihtoehto joidenkin *S. pseudintermedius* -kantojen metisilliiniresistenssin tunnistamisessa.

Aiemmissa tutkimuksissa on havaittu, että *mecA*-geenin koodaamaa muuntunutta penisilliiniä sitovaa proteiinia (PBP2a) ei ole mahdollista tunnistaa MALDI-TOF-massaspektrometrialla (Szabados ym. 2012), koska sen molekyylipaino on liian suuri (74 kDa) ja konsentraatio soluissa liian pieni (Josten ym. 2014).

3.5.1 Metisilliiniresistenssiin liittyvä biomarkkeri PSM-*mec*

Phenol Soluble Modulin (PSM) -peptidit ovat eri stafylokokkilajeilla esiintyviä virulenssitekijöitä, joita koodaavat geenit sijaitsevat bakteerin ydingenomissa ja tietyissä SCC*mec*-elementeissä (Li ym. 2014). Josten ym. (2014) havaitsivat, että SCC*mec*-elementtien II, III ja VIII koodaama PSM-*mec*-peptidi voidaan tunnistaa MALDI-TOF-menetelmällä ja näin erottaa tietyt MRSA-kannat MSSA-kannoista hyvällä tarkkuudella. PSM-*mec* tuottaa huipun sijaintiin 2415 +/- 4 m/z (Josten ym. 2014) tai 2415 +/- 2 m/z (Rhoads ym. 2016). PSM-proteiinin käyttöä metisilliiniresistenssin seulonnassa rajoittaa sen vähäinen määrä solussa. Tiedetään, että PSM-positiivisista MRSA – ja metisilliiniresistenteistä *S. epidermidis* -kannoista vain pieni osa tuottaa riittävästi PSM-proteiinia, jotta sen tuottama huippu voitaisiin havaita MALDI-TOF-spektrissä (Rhoads ym. 2016). Lisäksi on mahdollista, että proteiinierotusprotokollaan kuuluva

etanoliuhuhtelu poistaa näytteestä PSM-peptidin kaltaiset anionisesti varautuneet solun ulkopuoliset peptidit (Josten ym. 2014). PSM-*mec*-huipun käyttökelpoisuutta MRSP-seulonnessa ei toistaiseksi ole tutkittu. Tiedetään kuitenkin, että SCC*mec* III-kasetteja esiintyy myös MRSP-kannoilla (Wu ym. 2016). PSM-huipun automaattisesti seulova ohjelma MRSA-kantojen tunnistamiseksi on saatavilla Bruker Daltonicsilta (Bruker 2017c).

4 AINEISTO JA MENETELMÄT

4.1 Tutkitut bakteerikannat

Tutkimuksessa käsiteltiin kahta eri näytejoukkoa:

- 1) Metisilliiniresistenssin tunnistusta varten tutkittiin 10 MSSP- ja 10 MRSP-kantaa. Kannat oli tunnistettu tavanomaisin biokemiallisin menetelmin (Devriese ym. 2005), ja MRSP-kannoista oli varmistettu *mecA*-geenin olemassaolo reaaliaikaisella PCR-menetelmällä.
- 2) MRSP-kantojen tyypitystä varten tutkittiin 15 MRSP-kantaa. Kannat oli tyypitetty PFGE-menetelmällä käyttäen *Sma*I- ja *Asc*I -restriktioentsyymejä, ja jokaisesta pulssikenttäryhmästä ainakin yksi kanta oli jatkotyypitetty MLST-menetelmällä. Kannat edustivat sekvenssityyppejä ST45, ST71 ja ST258 niin, että kustakin sekvenssityypistä tutkittiin viisi kantaa. Kaikista MRSP-kannoista oli varmistettu *mecA*-geenin olemassaolo reaaliaikaisella PCR-menetelmällä.

Kaikki kannat olivat peräisin Helsingin yliopiston eläinlääketieteellisen tiedekunnan kliinisen mikrobiologian laboratorion kantakokoelmasta. Kannat oli eristetty laboratorioon lähetetyistä potilasnäytteistä vuosina 2011-2016. Osa kannoista oli peräisin eläinsairaalan omista potilaista ja osa ulkopuolisilta eläinklinikoilta eri puolilta Suomea. Kantoja oli säilytetty pakastettuna -80 °C:ssa.

4.2 Näytteiden esikäsittely

4.2.1 *mecA*-ominaisuuden tunnistaminen

Pakkasesta otetut bakteerikannat viljeltiin tryptoni-soija-veriagarille (TSA + 5 % lampaanverta, Oxoid, Saksa) ja inkuboitiin +35,5 °C + 5 % CO₂ yön yli. Seuraavana

päivänä kukin kanta viljeltiin kolmelle eri kasvatusalustalle: hajotusviljelmänä veriagarille, Brain-Heart-Infusion (BHI) -liemeen (10 ml) ja Mueller-Hinton (MH) -agarille (Oxoid, Saksa). MH-agarille viljelyä varten bakteerimassasta valmistettiin keittosuolaliuoksen kanssa tiheydeltään 0,45–0,54 McFarlandin yksikköä vastaava suspensio, joka levitettiin steriilillä vanupuikolla tasaiseksi kerrokseksi agarin pinnalle normaalin kiekkoherkkyysmäärittelyn tapaan. MRSP-kantojen metisilliiniresistenssin indusoimiseksi BHI-liemeen ja MH-agarille lisättiin 1 µg vahvuinen oksasilliinikiekkko (Oxoid, Iso-Britannia). BHI- ja MH-viljelmiä kasvatettiin +35,5 °C:ssa normaaliatmosfäärissä ja verimaljoja 5 % hiilidioksidiatmosfäärissä yön yli.

Tämän jälkeen BHI-lientä sisältävät putket sentrifugoitiin (5 min 3000 rpm) ja supernatantti poistettiin. 1 µl:n silmukallinen putken pohjalle jäänyttä bakteerimassaa siirrettiin Eppendorf-putkeen, ja käsiteltiin täyspitkällä (full extraction) -proteiininerotusmenetelmällä valmistajan ohjeen mukaan (Bruker 2016). Näin saaduista liuoksista pipetoitiin 1 µl supernatanttia MALDI Biotarget 96-näytelevylle.

MH- ja verimaljoilta otettiin näytteet koskettamalla bakteerimassaa kevyesti steriilillä puutikulla ja hiertämällä tikkuun tarttunut bakteerimassa näytelevyn kuoppiin. MH-maljoilta bakteerimassaa otettiin oksasilliinikiekkon estovyöhykkeen reunalta, jos sellainen oli, tai kiekkon vierestä, jos bakteeri kasvoi kiekkoon kiinni.

Näytteiden annettiin kuivua näytelevyllä huoneenlämmössä muutamasta minuutista kahteen tuntiin, jonka jälkeen niiden päälle pipetoitiin 1 µl HCCA (Bruker Matrix HCCA)-matriisiliuosta (Bruker Daltonics, Saksa). Liuoksen annettiin kuivua huoneenlämmössä muutaman minuutin ajan ennen mittausta. Laite oli kalibroitu BTS (*Bacterial Test Standard*) -standardikontrollin (Bruker Daltonics, Saksa) spektrin perusteella kaksi päivää ennen tutkittavien kantojen spektrin mittaamista.

4.2.2 Epidemiologinen tyypitys

Pakkasesta otetut bakteerikannat viljeltiin tryptoni-soija-veriagarille (TSA + 5 % lampaanverta, Oxoid, Saksa) ja kasvatettiin 5 % CO₂ -pitoisuudessa + 35 °C:ssa 24 tuntia. Seuraavana päivänä kannoista tehtiin jatkoviljelmä samalle agarille ja viljelmää kasvatettiin 24 tuntia samoissa olosuhteissa. Kustakin kannasta otettiin näytteeksi 1 µl silmukallinen bakteerimassaa, joka esikäsiteltiin täyspitkällä

proteiinierotusmenetelmällä kuten aiemmin. Bakteripellettien kuivatusaika vaiheessa 5 oli 6-7 minuuttia, ja muurahaishapon ja asetonitriilin määrä vaiheissa 6 ja 7 oli 30 µl. Näytteestä pipetoitiin 1 µl supernatanttia kahteen näytekuoppaan MALDI Biotarget 96 -näytelevylle. Matriisiliuoksena käytettiin 1 µl HCCA-liuosta. Ulkoisena kalibraationa käytettiin yhdessä näytekuopassa BTS (*Bacterial Test Standard*) (Bruker Daltonics, Saksa) -standardiliuosta.

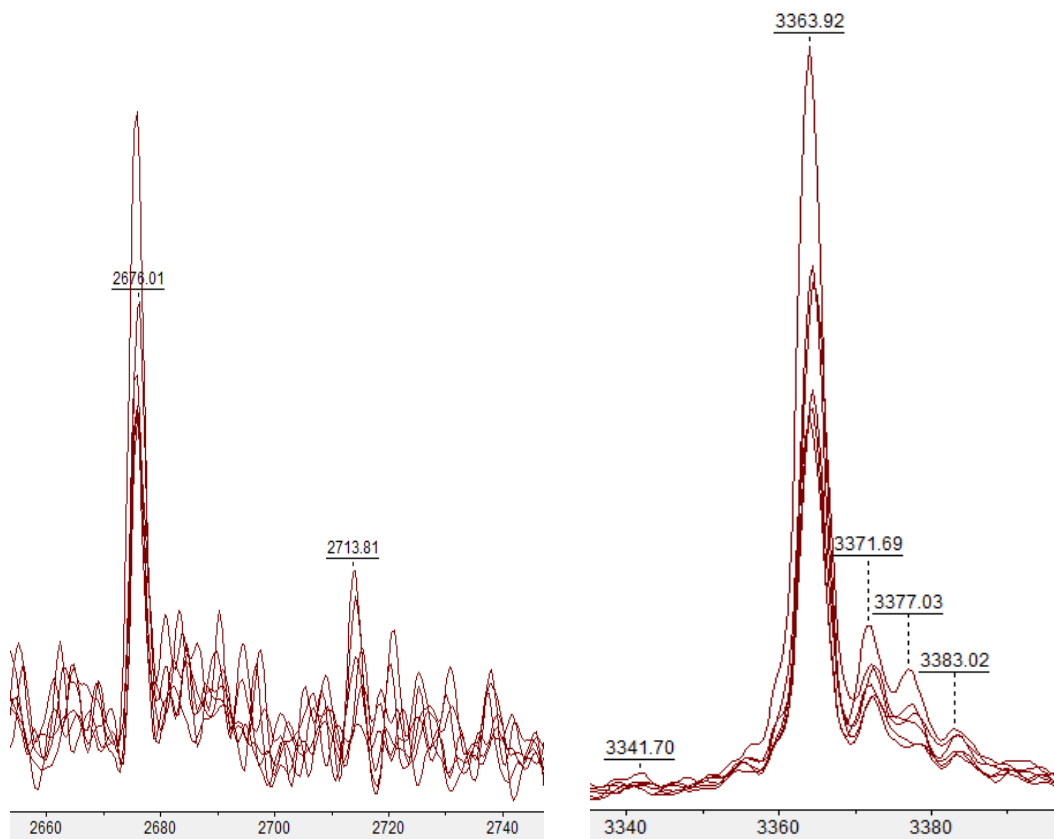
4.3 Mittaus ja lajintunnistus

Näytteiden spektrit mitattiin Microflex LT 3.1 MALDI-TOF MS -laitteella (Bruker Daltonics, maa) käyttäen lineaarista mittausmoodia ja MBT_AutoX-mittausohjelmaa. AutoX-ohjelmassa jokainen spektri muodostetaan ampumalla näytteeseen 240 laserpulsia 40 pulssin sarjoissa niin, että enintään 80 pulssia ammutaan samaan kohtaan. Käytetty kiihdytysjännite oli 20 kV ja mitattava massa-varausväli 2000 – 20 000 m/z. Tyypitystutkimuksessa jokaisesta näytteestä mitattiin kuusi rinnakkaista spektriä siten, että jokaisesta näytekuopasta mitattiin kolme spektriä. *mecA*-tunnistutkimuksessa jokaisesta näytteestä mitattiin yksi spektri. Lajintunnistus tehtiin vertaamalla näytteiden spektrejä Bruker-tietokannan referenssispektreihin MALDI BioTyper Compass Explorer 4.1 -ohjelmalla (Bruker Daltonics, Saksa).

4.4 Spektrianalyysi

4.4.1 Spektrien esikäsittely

Spektrijoukko tarkastettiin silmämääräisesti ns. outlier-mittausten varalta: spektrit, joiden korkeimpien huippujen intensiteetti olisi ollut viidesosa tai vähemmän muiden samaan ryhmään kuuluvien spektrien intensiteetistä, olisi poistettu tutkimuksesta. MSSP/MRSP-tunnistutkimuksessa outlier-spektrien vertailuryhmäksi katsottiin samalla alustalla kasvatetut MSSP- tai MRSP-kannat, ja tyypitystutkimuksessa kaikki samasta kannasta mitatut spektrit. Outlier-spektrejä ei kuitenkaan havaittu, joten kaikki mittaukset huomioitiin jatkoanalyysissä. Ennen jatkoanalyysiä kaikki spektrit käsiteltiin MBT_StandardFAMSMETHOD-suodattimen mukaisilla *smoothing*- ja *baseline subtraction* -toiminnoilla FlexAnalysis 3.4 -ohjelmalla (Bruker Daltonics, Saksa).



Kuva 2. Vasemmalla esimerkki selkeästä ja epäselvästä huipusta. Huippu 2676.01 luettiin selkeäksi ja huippu 2713.81 epäselväksi. Oikealla esimerkki intensiivisestä huipusta, jossa korkeamman massan puolella esiintyy kaksi pientä "hartiahuippua". Huippu 3363.92 luettiin selkeäksi ja huiput 3371.69 ja 3377.03 epäselviksi. Tyypitystutkimuksen MRSP-kanta ST71 P180.

4.4.2 Huippujen poiminta ja taulukointi

Huippujen poiminta tehtiin silmämääräisesti tarkastelemalla spektrejä päällekkäin ladotussa (*overlaid*) näkymässä FlexAnalysis 3.4 -ohjelmassa (Bruker Daltonics, Saksa). Tunnistustutkimuksessa kerralla tarkasteltavat spektrit (3 kpl) oli mitattu samasta kannasta, jota oli kasvatettu kolmella eri kasvatusalustalla. Tyypitystutkimuksessa kerralla tarkasteltavat spektrit (6 kpl) olivat peräisin yhdestä samalla alustalla kasvatetusta kannasta. Spektreissä havaituista huipuista laadittiin tunnistus- ja tyypitystutkimukselle erilliset taulukot, joihin kirjattiin kannan tunniste, huipun m/z-arvo ja huipun laatu (selkeä vs. epäselvä).

Huippu luettiin selkeäksi, mikäli

- i) sen intensiteetti oli merkittävästi taustahälyä suurempi, se oli muodoltaan kapea tai muutoin säännöllinen ja se esiintyi vähintään kahdessa kolmasosassa samasta kannasta mitattuja spektrejä

Huippu luettiin epäselväksi, mikäli

- ii) se oli kohdan i) mukainen, mutta esiintyi alle kahdessa kolmasosassa mitattuja spektrejä
- iii) sen intensiteetti oli matala ja/tai se oli muodoltaan epäsäännöllinen, mutta esiintyi vähintään kahdessa kolmasosassa samasta kannasta mitattuja spektrejä (ks. kuva 2)

Mukaan luettavien huippujen alin intensiteetti vaihteli kyseisen kohdan taustahälyn intensiteetin mukaan: alueilla, joilla taustahälyn intensiteetti oli matala, luettiin mukaan matalamman intensiteetin huippuja kuin korkean taustahälyn alueella.

4.4.3 Erottavien huippujen poiminta

Taulukoiden perusteella poimittiin jatkotarkasteluun sellaiset huiput, joiden esiintymisessä havaittiin säännönmukaisia eroja

- i) MSSP- ja MRSP-kantojen välillä
- ii) MRSP-kantojen sekvenssityyppien välillä.

Tyypitystutkimuksessa säännönmukaiseksi eroksi katsottiin sellainen huippu, joka esiintyi vähintään kolmella viidestä yhden sekvenssityypin kannasta ja puuttui kaikilta muilta, tai joka puuttui kaikilta yhden sekvenssityypin kannoilta ja esiintyi vähintään kolmella viidestä muiden sekvenssityyppien kannoista. Tunnistustutkimuksessa säännönmukaiseksi eroksi katsottiin sellainen huippu, joka esiintyi vähintään kuudella kymmenestä MRSP-kannasta ja puuttui kaikilta MSSP-kannoilta, tai joka esiintyi vähintään kuudella kymmenestä MSSP-kannasta ja puuttui kaikilta MRSP-kannoilta. Jos samassa kannassa havaittiin huippupari, jossa toisen huipun massa-varaussuhde oli kaksinkertainen toiseen nähden, jätettiin massa-varaussuhteeltaan pienempi, oletettavasti kaksoisvarautunut huippu huomioimatta.

Vain sellaiset huiput, jotka erottuivat taustahälystä yhteisnäkymässä, ja joiden korkeimman kohdan suhteellinen intensiteetti oli 500 a.u. (*arbitrary unit*) tai enemmän, hyväksyttiin lopulliseen erottavien huippujen listaan. Taulukoinnissa käytettyä jaottelua selkeisiin tai epäselviin huippuihin ei erottavien huippujen listassa enää noudatettu, vaan huiput merkittiin esiintyviksi (x) tai poissaoleviksi (-).

4.4.4 SCCmec-kompleksiin liittyvien biomarkerihuippujen tunnistaminen

Uniprot-tietokannasta (uniprot.org, haettu 18.5.2017) haettiin lista SCCmec-kompleksiin kuuluvien proteiinien massoista. Yhteensä löydettiin seitsemän proteiinia, joista yhden (MecI) massa (14 790 Da) oli tämän tutkimuksen mittausalueella. Tutkimuskantojen spektreistä laadittu taulukko tarkastettiin MecI-proteiinin massaan sopivan huipun havaitsemiseksi.

4.4.5 Klusterianalyysi

Kaikista tutkituista kannoista luotiin kantakohtaiset spektri-profiilit (engl. *Main Spectral Profile*, MSP), jotka yhdistävät useista mittauksista kertyneen spektri-informaation Maldi Biotyper Compass Explorer 4.1 -ohjelman MSP-algoritmien avulla. Tyypitystutkimuksessa kantakohtainen spektri-profiili luotiin yhdistämällä kuusi samasta näytteestä mitattua esikäsittelemätöntä spektriä, ja tunnistustutkimuksessa kolme.

Spektri-profiileista luotiin Biotyper-ohjelmalla massaspektrien samankaltaisuutta kuvaava dendrogrammi, jossa keskenään samankaltaisimman massa-varausspekttrin omaavat kannat sijoittuvat lähimmäksi toisiaan, ja vastaavasti keskenään erilaisimman massa-varausspekttrin omaavat kannat sijoittuvat kauimmaksi toisistaan.

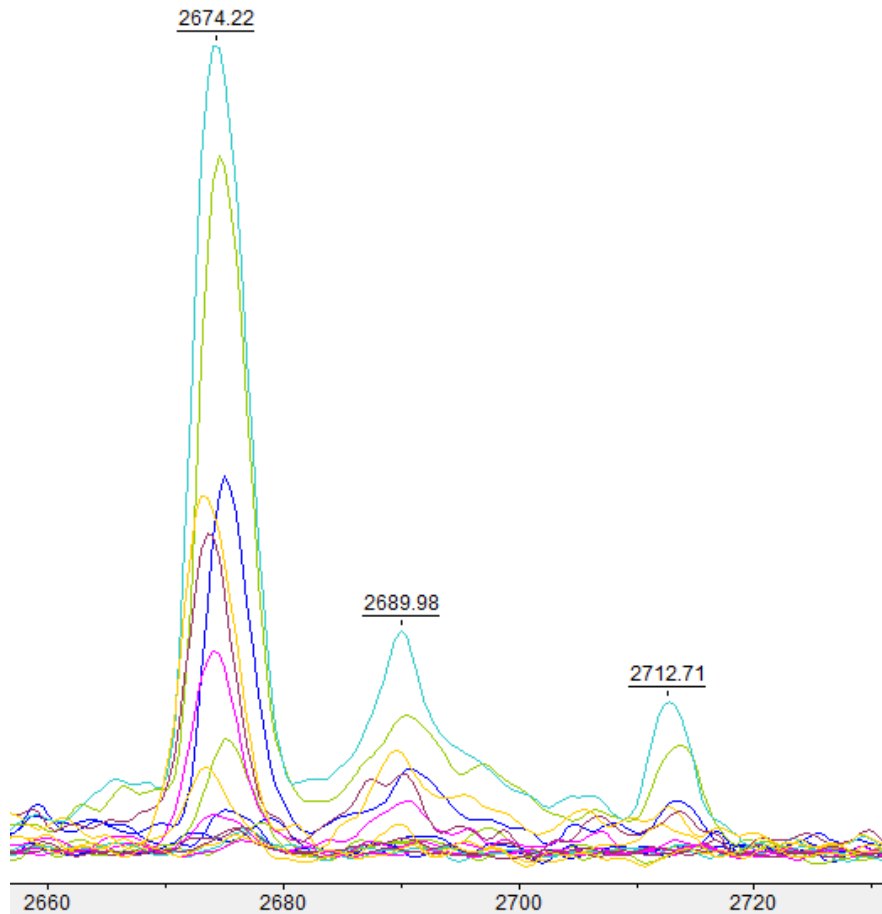
5 TULOKSET

5.1 Metisilliiniresistenssiominaisuuden tunnistaminen

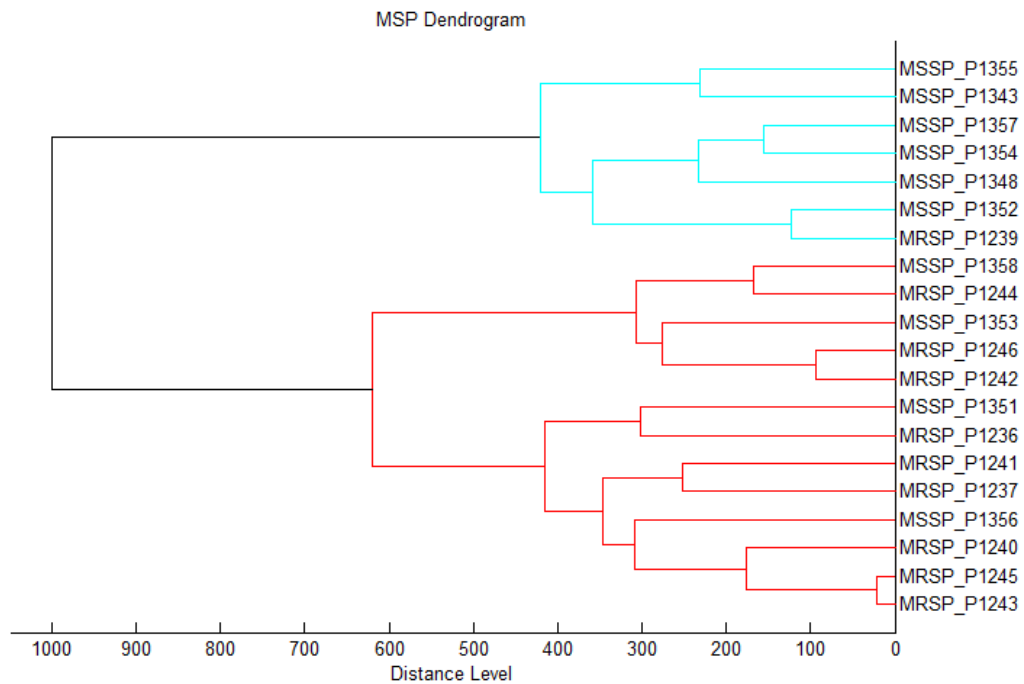
Kuudella MRSP-kannalla kymmenestä havaittiin välille 2688-2690 m/z sijoittuva huippu, jota ei havaittu yhdelläkään MSSP-kannalla. Viidellä kannalla kuudesta huippu esiintyi vain TSA + 5 % lampaanveriagarilla kasvatetun näytteen spektrissä, ja yhdellä kannalla kuudesta se esiintyi sekä TSA + 5 % lampaanveriagarilla että MH-agarilla kasvatetun näytteen spektrissä (ks. kuva 3). Huipun esiintyminen tyypitystutkimuksen MRSP-

kannoilla tarkastettiin huipputaulukosta: vain kaksi viidestätoista tyyppitutkimuksessa tutkitusta MRSP-kannasta oli tuottanut huipun vastaavaan sijaintiin.

Tunnistustutkimuksen kannoista laaditussa MSP-dendrogrammissa kuusi MSSP-kantaa ja yksi MRSP-kanta sijoittuivat dendrogrammin yhteen päähaaraan, ja loput neljä MSSP-kantaa ja yhdeksän MRSP-kantaa sijoittuivat toiseen päähaaraan (ks. kuva 4).



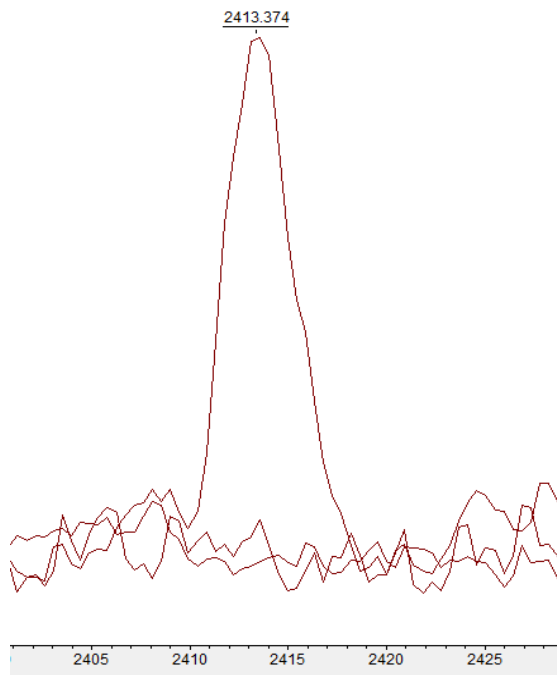
Kuva 3. *mecA*-tunnistustutkimuksessa havaittu MRSP- ja MSSP-kantoja erottava huippu 2688-2690 m/z. Veriagarilla kasvatettujen MRSP-kantojen P1236, P1239, P1240, P1241, P1243 ja P1246 spektrit muodostavat huipun sijaintiin 2688-2690 m/z.



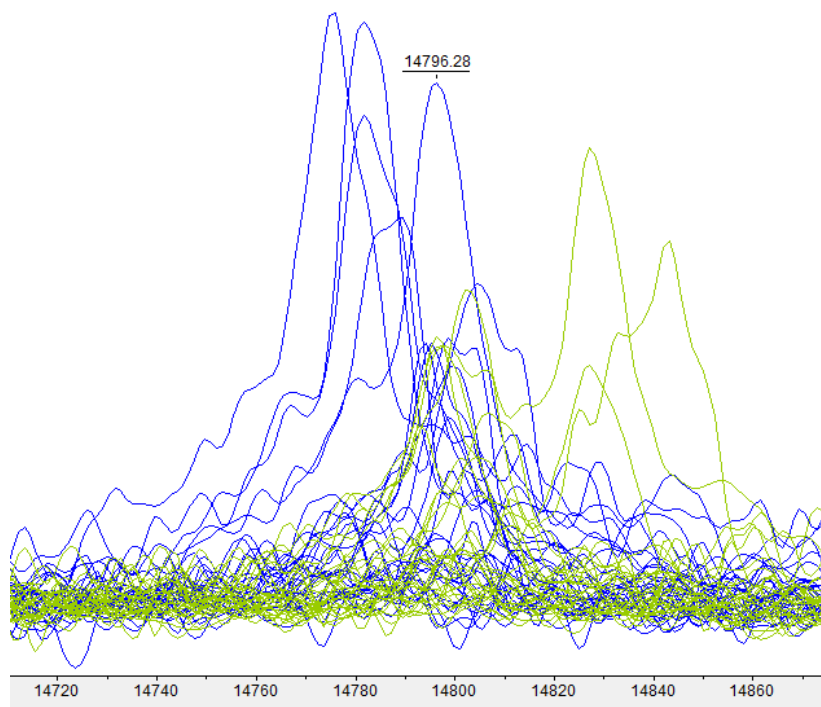
Kuva 4. *mecA*-tunnistustutkimuksen dendrogrammi. MRSP- ja MSSP-kannat sijoittuvat vaihtelevasti dendrogrammin kahteen päähaaraan.

Ainoastaan yhdessä MRSP P137-kannasta mitatussa spektrissä havaittiin *SCC_{mec}*-kompleksiin liittyvän PSM-*mec*-peptidin sijaintiin sopiva huippu (ks. kuva 5). Huipun muodostanut spektri oli mitattu lampaanveriagarilla kasvatetusta kannasta. Eri alustoilla kasvatetuilla MRSP P137- kannoilla tai muilla MRSP-kannoilla (ml. tyypitystutkimuksen MRSP-kannat) vastaavaa huippua ei havaittu.

MecI-proteiinin massa (14 790 Da) sopiva huippu havaittiin osalla tyypitys- ja tunnistustutkimuksen MRSP-kannoista, mutta myös kolmella MSSP-kannalla. Massatarkkuus on heikko yli 10 000 Da mentäessä, mikä vaikeutti huipun arviointia (ks. kuva 6).



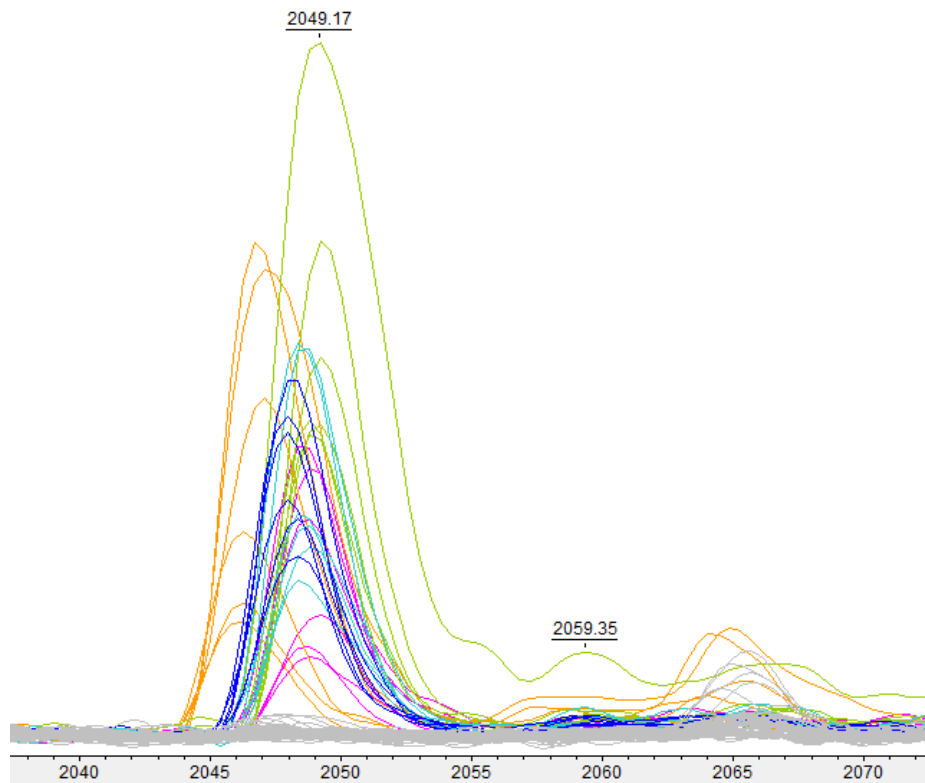
Kuva 5. SCC*mec*-ominaisuuteen liittyvän PSM-*mec*-peptidin (Josten ym. 2014, Rhoads ym. 2016) sijaintiin sopiva huippu *mecA*-tunnistustutkimuksen kannassa MRSP P137. Huipun muodostava spektri oli mitattu TSA + 5 % lampaanveriagarilla kasvatetusta kannasta. Muilla tutkituilla MRSP-kannoilla vastaavaa huippua ei todettu.



Kuva 6. SCC*mec*-ominaisuuteen liittyvän Mecl-proteiinin massan alueella esiintyviä huippuja. Huippuja muodostivat sekä osa MRSP-kannoista, että kolme MSSP-kantaa.

5.2 Epidemiologinen tyypitys

Sekvenssityyppien ST45, ST71 ja ST258 kannat pystyttiin erottamaan toisistaan huippujen 2047 \pm 2 m/z ja 4290 \pm 3 m/z esiintyvyyden perusteella. Näistä kahdesta huippu 2047 \pm 2 m/z assosioitui selkeimmin vain yhteen sekvenssityyppiin: se havaittiin kaikilla sekvenssityypin ST258 kannoilla, eikä yhdelläkään muiden sekvenssityyppien kannoista. Huippu esiintyi kaikissa mittauksissa selkeänä ja intensiivisenä (ks. kuva 7). Toinen huippu, 4290 \pm 3 m/z, havaittiin kaikilla sekvenssityypin ST71 kannoilla ja kolmella viidestä ST258 kannasta, mutta ei yhdelläkään sekvenssityypin ST45 kannoista. Yhteisesti tarkasteltuna nämä kaksi huippua mahdollistivat sekvenssityyppien ST45, ST71 ja ST258 silmämääräisen erottelun.



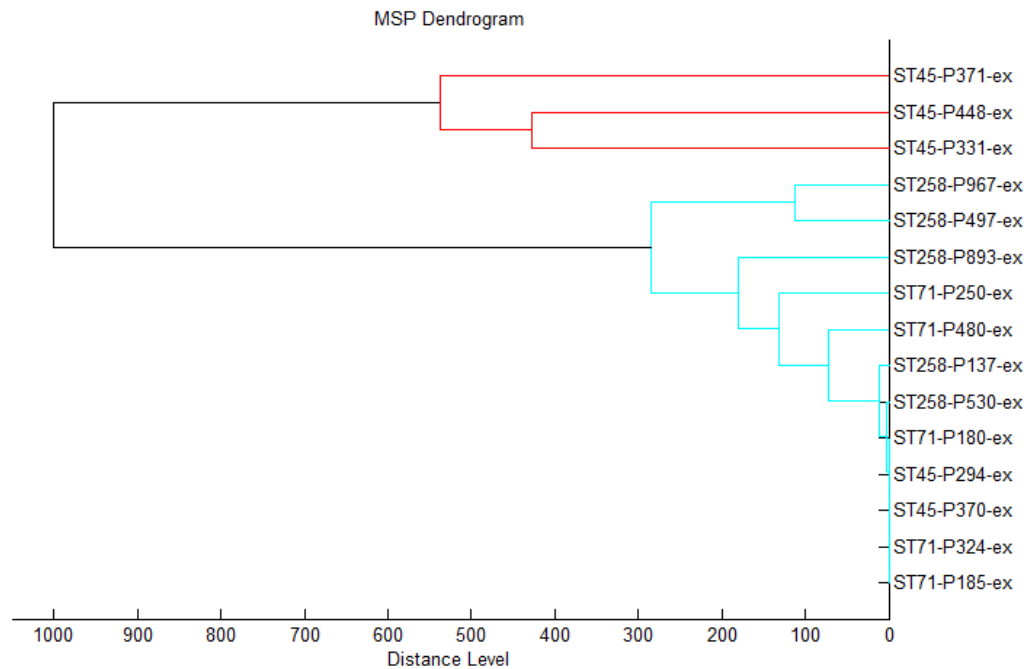
Kuva 7. MRSP ST258-kannat P497, P530, P893, P967 ja P137 muodostavat selkeän huipun sijaintiin 2047 \pm 2 m/z. Muiden sekvenssityyppien kannat eivät muodosta huippua.

Edellä mainittujen huippujen lisäksi myös useiden muiden huippujen esiintymisessä havaittiin eroja eri sekvenssityyppien välillä (ks. taulukko 1). Huippujen m/z-arvot on ilmoitettu taulukossa viiden m/z-yksikön vaihteluvälillä (± 2 m/z), paitsi huippu 4290 m/z, joka on ilmoitettu seitsemän m/z-yksikön vaihteluvälillä (± 3 m/z). Välittömästi toisiaan edeltävät tai seuraavat m/z-akselin arvoryhmät (ns. arvoryhmäparit) (6530 ± 2 m/z ja 6535 ± 2 m/z sekä 6607 ± 2 m/z ja 6612 ± 2 m/z) käsiteltiin erottavien huippujen kartoituksessa kokonaisuutena, koska erot niiden m/z-arvoissa ovat pieniä, ja vähäisen m/z-vaihtelun katsottiin saattavan heijastella eri muunnelmia samasta proteiinista. Taulukossa näiden huippujen esiintyvyys ilmoitetaan kuitenkin kahdessa erillisessä sarakkeessa.

Taulukko 1. Tyypitystutkimuksen kannoilla esiintyvät erottavat huiput. Sekvenssityyppien erottamisen yksinään mahdollistavat huiput 2047 ± 2 m/z ja 4290 ± 3 m/z ovat korostettuna.

Kanta	2031 ± 2	2047 ± 2	2788 ± 2	3596 ± 2	4290 ± 3	6530 ± 2	6535 ± 2	6607 ± 2	6612 ± 2	6830 ± 2
ST45 P294	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ST45 P331	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
ST45 P370	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ST45 P371	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
ST45 P448	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
ST71 P180	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
ST71 P185	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
ST71 P250	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
ST71 P324	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
ST71 P480	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ST258 P137	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
ST258 P497	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
ST258 P530	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
ST258 P893	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
ST258 P967	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-

Kannoista laaditussa dendrogrammissa ST45 kannat P331, P371 ja P448 ryhmittyvät omaan päähaaraan. Muut kannat, mukaan lukien ST45 kannat P294 ja P370, ryhmittyvät dendrogrammin toiseen päähaaraan. Näin ollen sekvenssityyppejä ST45, ST71 ja ST258 ei tässä tutkimuksessa pystytty erottamaan MSP-dendrogrammin avulla (ks. kuva 8).



Kuva 8. Tyypitystutkimuksen MSP-dendrogrammi. Kolme viidestä sekvenssityypin 45 kannasta sijoittuu omaan päähaaraan. Loput kannat sijoittuvat toiseen päähaaraan sekalaisessa järjestyksessä.

6 POHDINTA

6.1 Metisilliiniresistenssin tunnistuksen löydösten merkitys

MALDI-TOF-menetelmän soveltuvuutta *S. pseudintermediuksen* metisilliiniresistenssin tunnistamiseen tutkittiin kymmenestä kliinisestä MRSP- ja MSSP-kannasta koostuvassa näytejoukossa. Spektrien huiput tunnistettiin ja taulukoitiin, ja taulukon perusteella etsittiin MRSP- ja MSSP-kantoja erottavia huippuja. Yksi huippu täytti erottavalle huipulle asetetut kriteerit: huippu 2688-2690 m/z havaittiin kuudella MRSP-kannalla, mutta ei yhdelläkään MSSP-kannalla. Kyseisen huipun aiheuttavaa proteiinia ei tässä

tutkimuksessa identifioitu, joten ei tiedetä, liittyykö sen tuottanut proteiini metisilliiniresistenttiin genotyyppiin vai MRSP- ja MSSP-isolaattien väliseen klonaaliseen variaatioon. Huippu ei vaikuta olevan oksasilliinin indusoima, sillä viidellä kannalla kuudesta se havaittiin vain veriagarilla kasvatetussa isolaatissa, ja yhdellä kannalla kuudesta veriagarin lisäksi MH-agarilla (oksasilliinin kanssa) kasvatetussa isolaatissa. Huipun erottelupotentiaali ei tämän tutkimuksen perusteella vaikuta olevan kovin suuri, mutta mikäli sen voitaisiin osoittaa esiintyvän ainoastaan metisilliiniresistenteillä kannoilla, se voisi olla käyttökelpoinen.

Jostenin ym. (2014) aiemmin kuvaaman PSM-*mec*-peptidin sijaintiin sopiva huippu havaittiin vain yhdellä tutkituista MRSP-kannoista (MRSP P137), ja siinäkin vain yhdessä kolmesta isolaatista. Kantojen aiemman karakterisoinnin (Grönthal ym. 2017b) perusteella tiedetään, että kyseisen isolaatin SCC*mec*-elementti edustaa IV-tyyppiä, jonka ei toistaiseksi ole osoitettu kantavan PSM-*mec*-geeniä (Monecke ym. 2012). Tämän vuoksi on epätodennäköistä, että huipun tuottanut proteiini olisi todella PSM-*mec*.

MecI-proteiinin massaa (14 790 Da) karkeasti vastaavia huippuja havaittiin useiden MRSP-kantojen, mutta myös joidenkin MSSP-kantojen spektreissä. Koska MecI on tunnusomainen genotyyppisesti metisilliiniresistenteille kannoille, vaikuttaa siltä, että *S. pseudintermedius* voi tuottaa toista, metisilliiniresistenssiominaisuudesta riippumatonta proteiinia, joka on massaltaan jotakuinkin MecI-proteiinia vastaava. Huippujen tarkempi arviointi on haastavaa, sillä suurimassaisten molekyylien massatarkkuus oli tämän tutkimuksen mittauksissa melko heikko. Löydöksen merkityksen arvioimiseksi huipun muodostaneiden proteiinien identiteetti tulisi selvittää esimerkiksi MALDI-TOF/TOF-tandemmassaspektrometrian avulla.

MRSP- ja MSSP-kannoista laaditussa MSP-dendrogrammissa kuusi MSSP-kantaa ja yksi MRSP-kanta sijoittuivat dendrogrammin yhteen päähaaraan, ja loput kannat sijoittuivat toiseen päähaaraan. Tämä voi viitata siihen, että herkkien ja resistenttien *S. pseudintermedius*-kantojen välillä on jonkinlainen klonaalinen jakauma. Dun ym. (2002) tekemässä tutkimuksessa metisilliiniresistentit ja -sensitiiviset *S. aureus* -kannat sijoittuivat klusterianalyysissä selkeästi erikseen, minkä perusteella ne voitiin erottaa toisistaan melko hyvällä tarkkuudella. Tämä menetelmä vaatii kuitenkin aina

vertailukantoja, eikä sen vuoksi ole soveltuva resistenssin tunnistamiseen kliinisessä työssä. Kantojen ryvästymistä klusterianalyysissä ei muutenkaan voida pitää täysin luotettavana menetelmänä metisilliiniresistenssin havaitsemisessa (Spinali ym. 2015).

Oksasilliinipitoisessa ympäristössä kasvatettujen kantojen spektreissä ei havaittu sellaisia huippuja, joita ei olisi esiintynyt veriagarilla kasvatetuilla kannoilla. Mikäli oksasilliini olisi selkeästi indusoinut metisilliiniresistenssiominaisuuteen liittyvän proteiinin tuoton, se olisi kirjattu huipputaulukkoon selkeänä tai epäselvänä huippuna riippuen siitä, olisiko se havaittu molemmissa oksasilliinilla indusoidussa isolaateissa vai vain toisessa niistä. Samalla alustalla kasvatettujen eri MRSP-kantojen spektrien vertailu ei välttämättä olisi tuottanut helpommin vertailtavaa huippulistaa kuin nyt käytetty menetelmä, sillä eri MRSP-kantojen spektrien välinen vaihtelu saattaa olla merkittävää.

6.2 Epidemiologisen tyypityksen löydösten merkitys

MALDI-TOF-menetelmän soveltuvuutta MRSP-kantojen epidemiologiseen tyypitykseen tutkittiin yhteensä viidellätoista MRSP-kannalla, jotka edustivat sekvenssityyppejä ST45, ST71 ja ST258. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, voidaanko eri sekvenssityyppejä edustavat MRSP-kannat tunnistaa MALDI-TOF-massaspektrin perusteella. Spektrien huiput taulukoitiin, ja taulukon perusteella etsittiin toistuvia eroja eri sekvenssityyppejä edustavien kantojen spektreistä.

Sekvenssityypin ST258 kannoilla havaittiin selkeä ja intensiivinen huippu sijainnissa 2047 \pm 2 m/z. Huippu esiintyi kaikilla ST258 kannoilla, eikä yhdelläkään muiden sekvenssityyppien kannoista. Tämä mahdollisti kaikkien ST258 kantojen tunnistamisen. Yhdessä huipun 2047 \pm 3 m/z kanssa nämä kaksi huippua mahdollistivat sekvenssityyppien ST45, ST71 ja ST258 silmämääräisen erottelun.

Erottaviin huippuihin lukeutuvia huippuja 6530 \pm 2 m/z ja 6535 \pm 2 m/z sekä 6607 \pm 2 m/z ja 6612 \pm 2 m/z käsiteltiin pareittain siten, että molempien huippuparien tulkittiin mahdollisesti edustavan yhtä proteiinia. Huippujen taulukoinnin yhteydessä tehty "binning" eli tiettyjen massa-varausvälien (\pm 2 tai \pm 3 m/z) yhdistäminen on keinotekoinen jako, jonka tarkoituksena on helpottaa analyysiä ja kompensoida mahdollista mittausepä-tarkkuutta ja kalibrointivirhettä. Mikäli jonkin proteiinin todellinen massa on lähellä kahden korin ("bin") rajapintaa, on mahdollista, että

mittaukset jakautuvat epätarkkuuksien seurauksena eri korien alueelle. Ei ole myöskään poissuljettua, että MALDI-ionisaatiossa muodostuisi ESI (*Electron Spray Ionization*) -ionisaation tavoin erilaisia kemiallisia liitännäismolekyylejä, jotka voivat aiheuttaa pieniä tai suuria eroja mitattuihin massoihin. ESI-ionisaatioprosessissa muodostuvien liitännäismolekyylien tuottamia massaeroja on listattu toisaalla (Keller ym. 2008).

Tyypitystutkimuksen kannoista laaditussa MSP-dendrogrammissa kolme viidestä sekvenssityypin ST45 MRSP-kannasta (P331, P371 ja P448) ryhmittyi dendrogrammin yhteen päähaaraan, ja loput kaksi sekvenssityypin ST45 kantaa ryhmittyi muiden sekvenssityyppien kanssa toiseen päähaaraan. Tutkittuja sekvenssityyppejä ei tässä tutkimuksessa voitu erottaa toisistaan MSP-dendrogrammin avulla.

Tässä tutkimuksessa etsittiin sekvenssityyppikohtaisia biomarkkereita, mutta MALDI-TOF-tyypitykselle voitaisiin yhtä hyvin luoda myös PFGE- ja MLST-luokituksesta poikkeava luokittelumalli. Näin on tehty MRSA:n kohdalla esimerkiksi Østergaardin ym. (2015) tutkimuksessa, jossa MRSA-kantojen luokittelua varten laadittiin MALDI-TOF-spektrissä esiintyviin standardi- ja markkerihuippuihin perustuva malli. Mallin erottelukyvyn havaittiin olevan parempi kuin klonaalisten kompleksien ja heikompi kuin *spa*-tyypityksen, mutta monissa tapauksissa mukailevan kumpaakin.

MALDI-TOF-massaspektrometriallla voi olla vaikea saavuttaa yhtä hyvää taksonomista erottelukykä kuin DNA-pohjaisilla menetelmillä. MALDI-TOF-spektri heijastaa DNA:n emäsjärjestystä, mutta se on luonteensa vuoksi altis variaatioille; siihen vaikuttavat muun muassa geenien ilmentämisen säätely, proteiinien post-translacionaaliset modifikaatiot (Demirev ym. 2001), sekä matriisin aiheuttamat artefaktat (Keller ym. 2008). Mikäli MALDI-TOF-menetelmällä ei saavuteta epidemiologisessa tyypityksessä riittävää erottelutarkkuutta, tai jos sillä saatuja tuloksia halutaan varmentaa, tulisi epidemiologiset näytteet ohjata DNA-pohjaiseen tyypitykseen.

6.3 Huomioita tutkimusasetelmasta

Tutkimuksessa ei käytetty sisäistä massakalibraatiota, mikä saattaa heikentää spektrien massatarkkuutta ja aiheuttaa systemaattisen massavirheen. Esimerkiksi sekvenssityypin ST71 kannasta P324 mitatun spektrin huiput olivat säännönmukaisesti 1-2 m/z-yksikköä alempana kuin muiden spektrien huiput. Laite oli kuitenkin kalibroitu viikoittain BTS-

standardiliuoksella, minkä lisäksi tyyppitystutkimuksessa käytettiin BTS-standardiliuosta ulkoisena kalibraationa näytteiden mittaamisen yhteydessä. Tunnistustutkimuksessa laite oli kalibroitu ulkoisesti kaksi päivää ennen näytteiden tutkimista. Tilanne vastaa normaalia kliinistä analytiikkaa, jossa laite kalibroidaan viikoittain.

Tutkimuksen data-analyysi perustuu spektrien visuaaliseen tarkasteluun ja erottavien huippujen kantakohtaiseen taulukointiin. Visuaalinen tarkastelu on väistämättä subjektiivista, vaikka siinä noudatettaisiinkin tiettyjä reunaehtoja. Huippuvalinnan kriteerit asetettiin tässä tutkimuksessa mielivaltaisesti (ottaen kuitenkin huomioon muiden tutkimusten kriteerejä) sillä yleistettävää, pitävää määritelmää huippujen riittävälle toistettavuudelle, resoluutiolle ja intensiteetille ei ole vielä määritelty.

Huippujen toistettavuutta ei tässä tutkimuksessa kvantifioitu, mutta joidenkin huippujen toistettavuus vaikutti silmämääräisesti heikolta: huiput saattoivat esiintyä vain yhdessä samasta kannasta tai jopa samasta näytteestä mitatuista spektreistä. Lajintunnistuksessa heikosti toistettavat huiput eivät todennäköisesti olisi merkityksellisiä, mutta kantatason tyyppityksessä ne saattavat olla (Lasch ym. 2016).

Huipun toistettavuuteen liittyy myös kysymys huipun alimmasta hyväksyttävästä intensiteetistä. MALDI-ionisaatiolle on ominaista, että matriisi ja näyte muodostavat niin sanottuja ”hot spoteja” tai ”sweet spoteja”, joissa mitattavaa materiaalia on runsaasti, ja toisaalta sellaisia alueita, joissa mitattavaa materiaalia on vähän (Basile ja Mignon 2016). Tämä vaikuttaa spektrin kokonaisintensiteettiin: heikosta kohdasta tehty mittaust voi tuottaa runsaslukuisinakin esiintyvistä, hyvin ionisoituvista proteiineista matalan intensiteetin huippuja, mikä puolestaan alentaa matalalla intensiteetillä havaittavia huippuja entistään matalammiksi. Saman huipun intensiteetti voi vaihdella huomattavasti jopa samasta näytteestä tehtyjen peräkkäisten mittausten välillä. Mittausten toistettavuutta pyritään parantamaan koostamalla jokainen spektri muutamaa eri paikkaan kohdennettujen kymmenien tai satojen laserpulssien tuottamasta ionisaannosta. Spektrien ylimmän intensiteetin tarkastaminen ja heikkojen mittausten poistaminen on kuitenkin tärkeää väärin negatiivisten tulosten vähentämiseksi.

Visuaalisessa huippupoiminnassa mukaan luettavien huippujen intensiteetille voidaan asettaa pitävä alaraja, mutta silloin ei pystytä huomioimaan taustahälyn intensiteetin vaihtelua – esimerkiksi intensiteetiltään 400 a.u. huippu voi yhdessä spektrin kohdassa erottua selkeänä, ja toisessa hukkaa taustahälyyn. Tilastollisia data-analyysiohjelmia käytettäessä huipuille voidaan asettaa alin hyväksyttävä signaali-melu-suhde, joka karsii taustahälyyn suhteutettuna intensiteetiltään liian matalat huiput pois. Tässä tutkimuksessa erottavien huippujen intensiteetin alarajaksi asetettiin 500 a.u., mikä on enemmän kuin esimerkiksi aiemmin mainitussa Østergaardin ym. (2015) MRSA-kantojen epidemiologista tyypitystä käsittelevässä tutkimuksessa.

Data-analyysin toistettavuuden parantamiseksi ja satunnaisvirheiden (esimerkiksi huipun virheellinen kirjaus taulukkoon) välttämiseksi huippujen poiminta olisi hyvä tehdä sokkoutettuna useamman henkilön toimesta, tai vaihtoehtoisesti siirtyä kokonaan tilastolliseen data-analyysiin. Visuaalisen data-analyysin käyttöä tässä tutkimuksessa puoltaa kuitenkin se, että se on nopeasti omaksuttava ja pienillä näytämäärillä työmäärältään kohtuullinen menetelmä, jolla voidaan kartoittaa spektrien välisiä selkeitä eroja ja alustavia biomarkkerihuippuja. Huolellisesti tehtynä sillä saadaan myös toistettavia tuloksia: esimerkiksi Woltersin ym. (2010) raportoimat MRSA-kantoja erottavat huiput 3276, 3876, 4511, 5002 and 6591 m/z poimittiin alun perin yksinkertaisella visuaalisella analyysillä, ja vahvistettiin myöhemmin Camoezin ym. (2016) tutkimuksessa. Visuaalisella data-analyysillä ja pienillä näytämäärillä saatuja tuloksia on kuitenkin pääsääntöisesti pidettävä alustavina, ja menetelmän rajoitteet on otettava huomioon tulosten tulkinnessa.

6.4 Pohdinnan yhteenveto

Tämä on tietääkseni ensimmäinen tutkimus, jossa käsitellään MALDI-TOF-menetelmän soveltuvuutta *S. pseudintermediuksen* metisilliiniresistenssiominaisuuden tunnistamiseen ja MRSP-kantojen epidemiologiseen tyypitykseen. Tutkimuksessa verrattiin eri kasvatusalustoilla kasvatettujen MRSP- ja MSSP-kantojen spektrejä, ja etsittiin kohdennetusti kahta metisilliiniresistenssiin liittyvää biomarkkeria: PSM-*mec*-peptidiä ja *MecI*-proteiinia. MRSP- ja MSSP-kannoille tehtiin myös klusterianalyysi, jossa selkeää jakoa resistentteihin ja herkkiin kantoihin ei muodostunut. Yksiselitteisesti metisilliiniresistenssiin yhdistyviä biomarkkerihuippuja ei havaittu, mikä on linjassa

Szabadosin ym. (2012) isogeenisillä MRSA- ja MSSA-kannoilla tekemän tutkimuksen kanssa. MecI-proteiinin massa-alueella havaitut huiput olisi mielenkiintoista tunnistaa esimerkiksi MALDI TOF/TOF-tandemmassaspektrometrian avulla, jotta tiedettäisiin, onko osa niistä MecI-proteiinin aiheuttamia.

MRSP-sekvenssityypit ST45, ST71 ja ST258 pystyttiin erottamaan toisistaan huippujen 2047 \pm 2 m/z ja 4290 \pm 3 m/z esiintymisen perusteella. Klusterianalyysissä eri sekvenssityyppien erottaminen ei onnistunut, sillä kaikki kannat ryhmittäytyivät dendrogrammissa samaan haaraan lukuun ottamatta kolmea sekvenssityypin ST45 kantaa. Tyypitystutkimuksen tulokset ovat erottavien huippujen osalta lupaavia, mutta yleistettävien päätelmien vetäminen edellyttäisi suuremmalla näytemäärällä tehtävää jatkotutkimusta. MALDI-TOF-menetelmällä MRSP-sekvenssityyppien tunnistaminen voisi parhaimmillaan olla mahdollista tehdä rutiininomaista lajintunnistusta varten mitatun datan perusteella, mikä säästäisi merkittävästi henkilö- ja materiaaliressursseja ja mahdollistaisi epidemioiden aiempaa nopeamman tunnistamisen.

7 LÄHTEET

Alatoom AA, Cunningham SA, Ihde SM, Mandrekar J, Patel R. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011, 49: 2868-73.

Anderson NW, Buchan BW, Riebe KM, Parsons LN, Gnacinski S, Ledebor NA. Effects of Solid-Medium Type On Routine Identification of Bacterial Isolates By Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012, 50: 1008-1013.

Arêde P, Milheirico C, de Lencastre H, Oliveira DC. The Anti-Repressor MecR2 Promotes the Proteolysis of the *mecA* Repressor and Enables Optimal Expression of β -lactam Resistance in MRSA (Role of Anti-Repressor MecR2 on the MRSA Phenotype). *PLoS Pathogens* 2012, 8: e1002816.

Awad, H, Khamis M, El-Aneed A. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. *Appl Spectrosc Rev* 2014.

Barbier F, Ruppé E, Hernandez D, Lebeaux D, Francois P, Felix B, Desprez A, Maiga A, Woerther PL, Gaillard K, Jeanrot C, Wolff M, Schrenzel J, Andremont A, Ruimy R. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of SCCmec IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2010, 202: 270-81.

Basile F. ja Mignon RK. Methods and instrumentation in mass spectrometry for the differentiation of closely related microorganisms. Teoksessa: Demirev, P. ja Sandrin TR. (toim.) *Applications of Mass Spectrometry in Microbiology: From Strain Characterization to Rapid Screening for Antibiotic Resistance*. E-kirja. Springer, Sveitsi. 2016: 13-50.

Beck KM, Waisglass SE, Dick HL, Weese JS. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from skin and carriage sites of dogs after

treatment of their meticillin-resistant or meticillin-sensitive staphylococcal pyoderma. Vet Dermatol 2012, 23: 369-75.

Bernardo K, Pakulat N, Macht M, Krut O, Seifert H, Fleer S, Hüngrer F, Krönke M. Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. Proteomics 2002, 2: 747-53.

bioMérieux 2017. <http://www.biomerieux-usa.com/biomerieux-announces-us-fda-clearance-vitek-ms-revolutionary-technology-which-reduces-microbial>. Haettu 15.10.2017.

Blázquez B, Llarrull LI, Luque-Ortega JR, Alfonso C, Boggess B, Mobashery S. Regulation of the expression of the β -lactam antibiotic-resistance determinants in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Biochemistry (N Y) 2014, 53: 1548-50.

Bloemendaal AL, Brouwer EC, Fluit AC. Methicillin Resistance Transfer from *Staphylococcus epidermidis* to Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in a Patient during Antibiotic Therapy (SCC mec Transfer). PLoS ONE 2010, 5: e11841.

Bruker 2016. MALDI Biotyper Protocol Guide, 4 p.

Bruker 2017a. <https://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/ivd-ce-certified-maldi-biotyper.html>. Haettu 15.10.2017.

Bruker 2017b. <http://ir.bruker.com/investors/press-releases/press-release-details/2015/Bruker-Announces-FDA-Clearance-for-Second-Expanded-Claim-for-the-MALDI-Biotyper-CA-System/default.aspx>. Haettu 15.10.2017.

Bruker 2017c. https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/Literature/Brochures/1845393_MBT_Subtyping_brochure_08-2016_ebook.pdf. Haettu 18.10.2017.

Bycroft BW, Shute RE. The Molecular Basis for the Mode of Action of Beta-Lactam Antibiotics and Mechanisms of Resistance. Pharm Res 1985, 2: 3-14.

Böhme K, Morandi S, Cremonesi P, Fernández No IC, Barros-Velázquez J, Castiglioni B, Brasca M, Cañas B, Calo-Mata P. Characterization of *Staphylococcus aureus*

strains isolated from Italian dairy products by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis* 2012, 33: 2355-64.

Camoez M, Sierra JM, Dominguez MA, Ferrer-Navarro M, Vila J, Roca I. Automated categorization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates into different clonal complexes by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infec* 2016, 22: 161

Cooper JE, Feil EJ. Multilocus sequence typing – what is resolved? *Trends Microbiol* 2004, 12: 373-377.

Decristophoris P, Fasola A, Benagli C, Tonolla M, Petrini O. Identification of *Staphylococcus intermedius* Group by MALDI-TOF MS. *Syst Appl Microbiol* 2011, 34: 45-51.

Demirev PA, Lin JS, Pineda FJ, Fenselaut C. Bioinformatics and mass spectrometry for microorganism identification: proteome-wide post-translational modifications and database search algorithms for characterization of intact *H. pylori*. *Anal Chem* 2001, 73: 4566.

Devriese LA, Hermans K, Baele M, Haesebrouck F. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. *Veterinary Microbiology* 2009, 133: 206-7.

Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, Vaneechoutte M, De Graef E, Snauwaert C, Cleenwerck I, Dawyndt P, Swings J, Decostere A, Haesebrouck F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005, 55: 1569-73.

Dieckmann R, Helmuth R, Erhard M, Malorny B. Rapid Classification and Identification of Salmonellae at the Species and Subspecies Levels by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74: 7767-7778.

Dos Santos TP, Damborg P, Moodley A, Guardabassi L. Systematic Review on Global Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: Inference of Population Structure from Multilocus Sequence Typing Data. *Front Microbiol* 2016, 18: 1599

Du Z, Yang R, Guo Z, Song Y, Wang J. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 2002, 74: 5487-91.

Duim B, Verstappen KM, Broens EM, Laarhoven LM, van Duijkeren E, Hordijk J, de Heus P, Spaninks M, Timmerman AJ, Wagenaar JA. Changes in the population of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and dissemination of antimicrobial-resistant phenotypes in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 2016, 54: 283-8.

Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol* 2000, 49: 295-300.

Fuda C, Suvorov M, Vakulenko SB, Mobashery S. The basis for resistance to beta-lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*. 2004, 279: 40802-6.

Georgopapadakou NH, Dix BA, Mauriz YR. Possible physiological functions of penicillin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986, 29: 333-336.

Gortel K, Campbell KL, Kakoma I, Whittem T, Schaeffer DJ, Weisiger RM. Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. *Am J Vet Res* 1999, 60: 1526-30.

Grönthal T. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Finland [dissertation] University of Helsinki 2017a.

Grönthal T, Eklund M, Thomson K, Piiparinen H, Sironen T, Rantala M. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and the molecular epidemiology of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* in small animals in Finland. *J Antimicrob Chemother* 2017b, 72: 1021–1030.

Grönthal T, Moodley A, Nykäsenoja S, Junnila J, Guardabassi L, Thomson K, Rantala M. Large Outbreak Caused by Methicillin Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71 in a Finnish Veterinary Teaching Hospital - From Outbreak Control to Outbreak Prevention. *PLoS One* 2014, 9: e110084.

Grönthal T, Ollilainen M, Eklund M, Piiparinen H, Gindonis V, Junnila J, Saijonmaa-Koulumies L, Liimatainen R, Rantala M. Epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in guide dogs in Finland. *Acta Vet Scand* 2015, 57: 37.

Haglund RF. Mechanisms of Laser-Induced Desorption and Ablation. *Experimental Methods in the Physical Sciences* 1997, 30: 15-138.

Hanssen AM, Sollid JU. Multiple staphylococcal cassette chromosomes and allelic variants of cassette chromosome recombinases in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from Norway. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51: 1671-7.

Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1984, 158: 513-516.

Herschleb J, Ananiev G, Schwartz DC. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc* 2007, 2: 677-84.

Hughes DL. Patent Review of Manufacturing Routes to Fifth-Generation Cephalosporin Drugs. Part 2, Ceftaroline Fosamil and Ceftobiprole Medocaril. *Organic Process Research and Development* 2017, 21: 800-815.

Josten M, Dischinger J, Szekat C, Reif M, Al-Sabti N, Sahl HG, Parcina M, Bekeredjian-Ding I, Bierbaum G. Identification of agr-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring the class A *mec* complex by MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Med Microbiol* 2014, 304: 1018-23.

Josten M, Reif M, Szekat C, Al-Sabti N, Roemer T, Sparbier K, Kostrzewa M, Rohde H, Sahl HG, Bierbaum G. Analysis of the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrum of *Staphylococcus aureus* Identifies Mutations That Allow Differentiation of the Main Clonal Lineages. *J Clin Microbiol* 2013, 51: 1809-17.

Kawakami T, Shibata S, Murayama N, Nagata M, Nishifuji K, Iwasaki T, Fukata T. Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 2010, 72: 1615-9.

Keller BO, Sui J, Young AB, Whittall RM. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2008, 627: 71-81.

Kjellman EE, Slettemeås JS, Small H, Sunde M. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from healthy dogs in Norway – occurrence, genotypes and comparison to clinical MRSP. *MicrobiologyOpen* 2015, 4: 857-66.

Kostrzewa M, Sparbier K, Maier T, Schubert S. MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. *Proteom Clin Appl* 2013, 7: 767-78.

Krause E, Wenschuh H, Jungblut PR. The Dominance of Arginine-Containing Peptides in MALDI-Derived Tryptic Mass Fingerprints of Proteins. *Anal Chem* 1999, 71: 4160-5.

Lääkekieltoasetus 847/2008 muutoksineen.

<http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2008/20080847>. Haettu 17.10.2017.

Lasch P, Jacob D, Klee S., Werner G. Discriminatory Power of MALDI-TOF Mass Spectrometry for Phylogenetically Closely Related Microbial Strains. Teoksessa: Demirev, P. ja Sandrin TR. (toim.) *Applications of Mass Spectrometry in Microbiology: From Strain Characterization to Rapid Screening for Antibiotic Resistance*. E-kirja. Springer, Switzerland 2016: 13-50.

Lasch P, Fleige C, Stämmeler M, Layer F, Nübel U, Witte W, Werner G. Insufficient discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* isolates. *J Microbiol Methods* 2014, 100: 58-69.

Lee J. *Staphylococcus intermedius* isolated from dog-bite wounds. *J Infect.* 1994, 29: 105.

Lehner G, Linek M, Bond R, Lloyd DH, Prenger-Berninghoff E, Thom N, Straube I, Verheyen K, Loeffler A. Casecontrol risk factor study of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) infection in dogs and cats in Germany. *Vet Microbiol* 2014, 168: 154-60.

Li S, Huang H, Rao X, Chen W, Wang Z, Hu X. Phenol-soluble modulins: novel virulence-associated peptides of staphylococci. *Future Microbiol* 2014: 203-16.

Lilenbaum W, Esteves AL, Souza GN. Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from saliva of clinically normal cats. Lett Appl Microbiol 1999, 28: 448-52.

Lilenbaum W, Nunes EL, Azeredo MA. Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from the skin surface of clinically normal cats. Lett Appl Microbiol 1998, 27: 224-8.

Liu H, Zongmin Du, Jin Wang, and Ruifu Yang. Universal Sample Preparation Method for Characterization of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. Appl Environ Microbiol 2007, 73: 1899-1907.

Loeffler A, Linek M, Moodley A, Guardabassi L, Sung JM, Winkler M, Weiss R, Lloyd DH. First report of multiresistant, mecA-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. Vet Dermatol 2007, 18: 412-21.

Majcherczyk PA, McKenna T, Moreillon P, Vaudaux P. The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett. 2006, 255: 233-239.

Monecke S, Engelmann I, Archambault M, Coleman DC, Coombs GW, Cortez de Jäckel S, Pelletier-Jacques G, Schwarz S, Shore AC, Slickers P, Ehricht R. Distribution of SCCmec-associated phenol-soluble modulin in staphylococci. Mol Cell Probes 2012, 26: 99-103.

Murugaiyan J, Rosler U, Semmler T, Vincze S, Abou Elnaga Y, Stamm I, Kopp PA, Wieler LH, Lubke-Becker A, Walther B. Evaluation of *S. pseudintermedius* differentiation using molecular marker analysis and MALDI TOF MS. Int J Med Microbiol 2011, 301: 9.

Nienhoff U, Kadlec K, Chaberny IF, Verspohl J, Gerlach GF, Kreienbrock L, Schwarz S, Simon D, Nolte I. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs admitted to a small animal hospital. Vet Microbiol 2011, 150: 191-7.

Nomura F. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionizationtime of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. Proteins and Proteomics 2015, 1854: 528-37.

Østergaard C, Hansen SG-K, Møller J. Rapid first-line discrimination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains using MALDI-TOF MS. Int J Med Microbiol 2015, 305: 838-47.

Paauw A, Jonker D, Roeselers G, Heng JM, Mars-Groenendijk RH, Trip H, Molhoek EM, Jansen HJ, van der Plas J, de Jong AL, Majchrzykiewicz-Koehorst JA, Speksnijder AG. Rapid and reliable discrimination between *Shigella* species and *Escherichia coli* using MALDI-TOF mass spectrometry. Int J Med Microbiol 2015, 305: 446-52.

Papich MG. Selection of antibiotics for methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: time to revisit some old drugs? Vet Dermatol 2012, 23: 352-60.

Park JS, The Choi SH, Hwang SM, Hong YJ, Kim TS, Park KU, Song J, Kim EC. The impact of protein extraction protocols on the performance of currently available MALDI-TOF mass spectrometry for identification of mycobacterial clinical isolates cultured in liquid media. Clinica Chim Acta 2016, 460: 190-5.

Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Annu Rev Biochem 2015, 84: 577-601.

Perreten V, Chanchaithong P, Prapasarakul N, Rossano A, Blum SE, Elad, Schwendener S. Novel pseudo-staphylococcal cassette chromosome mec element (ψ SCCmec57395) in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* CC45. Antimicrob Agents Ch 2013, 57: 5509-5515.

Perreten V, Kadlec K, Schwarz S, Grönlund Andersson U, Finn M, Greko C, Moodley A, Kania SA, Frank LA, Bemis DA, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Duim B, Wagenaar JA, van Duijkeren E, Weese JS, Fitzgerald JR, Rossano A, Guardabassi L. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. J Antimicrob Chemoth 2010, 65: 1145-54.

pubMLST 2017. <https://pubmlst.org/spseudintermedius/>. Haettu 17.10.2017.

Quinn PJ, Marky PK, Leonard FC, Fanning S, Hartigan PJ. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 2. p. Blackwell Science Ltd, Chichester 2011.

Rhoads DD, Wang H, Karichu J, Richter SS. The presence of a single MALDI-TOF mass spectral peak predicts methicillin resistance in staphylococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016, 86: 257-61.

Rubin JE, Chirino-Trejo M. Prevalence, Sites of Colonization, and Antimicrobial Resistance Among *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Healthy Dogs in Saskatoon, Canada. *J Vet Diagn Invest* 2011, 23: 351-4.

Ryffel C, Kayser FH, Berger-Bächi B. Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1992, 36: 25-31.

Ryzhov V, Fenselau C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Anal Chem* 2001, 73: 746-750.

Ryzhov V, Hathout Y, Fenselau C. Rapid Characterization of Spores of *Bacillus cereus* Group Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66: 3828-34.

Sasaki T, Kikuchi K, Tanaka Y, Takahashi N, Kamata S, Hiramatsu K. Reclassification of Phenotypically Identified *Staphylococcus intermedius* Strains. *J Clin Microbiol* 2007, 45: 2770-2778.

Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2008, 32: 234-58.

Šedo O, ja Zdráhal Z. Modulation of the Discriminatory Power of MALDI-TOF MS Profiling for Distinguishing Between Closely Related Bacterial Strains. Teoksessa: Demirev, P. ja Sandrin TR. (toim.) *Applications of Mass Spectrometry in Microbiology: From Strain Characterization to Rapid Screening for Antibiotic Resistance*. E-kirja. Springer, Switzerland 2016: 185-202.

Šedo O, Sedláček I, Zdráhal Z. Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria. *Mass Spectrom Rev* 2011, 30: 417-34.

Šedo O, Vávrová A, Vad'urová M, Tvrzová L, Zdráhal Z. The influence of growth conditions on strain differentiation within the *Lactobacillus acidophilus* group using

matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry profiling. Rapid Commun Mass Sp 2013, 27: 2729-36.

Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. (Clinical report). Clin Infect Dis 2009, 49: 543-51.

Shah HN, Rajakaruna L, Ball G, Misra R, Al-Shahib A, Fang M, Gharbia SE. Tracing the transition of methicillin resistance in sub-populations of *Staphylococcus aureus*, using SELDI-TOF Mass Spectrometry and Artificial Neural Network Analysis. Syst Appl Microbiol 2011, 33: 81-6.

Shan W, Li J, Fang Y, Wang X, Gu D, Zhang R. Rapid Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by the Vitek MS Saramis system. Curr Microbiol 2016, 72: 29-32.

Silva M, Ferreira FA, Garcia LN, Silva-Carvalho MC, Botelho LA, Figueiredo AM, Vieira-da-Motta O. An evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine infections. J Vet Diagn Invest 2015, 27: 231-5.

Solyman SM, Black CC, Duim B, Perreten V, van Duijkeren E, Wagenaar JA, Eberlein LC, Sadeghi LN, Videla R, Bemis DA, Kania SA. Multilocus Sequence Typing for Characterization of *Staphylococcus pseudintermedius*. J Clin Microbiol 2013, 51: 306-10.

Spinali S, van Belkuma A, Goeringb RV, Girarda V, Welkera M, Van Nuenenc M, Pincusd DH, Arsace M, Duranda G. Microbial typing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: Do we need guidance for data interpretation? J Clin Microbiol 2015, 53: 760-5.

Sun Z, Zhang W, Chen X. Rapid method study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* identified by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Wei Sheng Yan Jiu 2011, 40: 375-8.

Szabados F, Kaase M, Anders A, Gatermann SG. Identical MALDI TOF MS-derived peak profiles in a pair of isogenic SCCmec-harboring and SCCmec-lacking strains of *Staphylococcus aureus*. J Infect 2012, 65: 400-5.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995, 33: 2233-9.

Terauchi R, Sato H, Hasegawa T, Yamaguchi T, Aizawab C, Maeharaa N. Isolation of exfoliative toxin from *Staphylococcus intermedius* and its local toxicity in dogs. Vet Microbiol 2003, 94: 19-29.

Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCCmec) Classification and Typing Methods: an Overview. Pol J Microbiol 2011, 60: 95-103.

Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, Petersen C, Wahl K. Effects of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Appl Environ Microbiol 2005, 71: 58-64.

van Duijkeren E, Kamphuis M, van Der Mije IC, Laarhoven LM, Duim B, Wagenaar JA, Houwers DJ. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. Vet Microbiol 2011a, 150: 338-343.

van Duijkeren E, Catry B, Greko C, Moreno MA, Pomba MC, Pyörälä S, Ruzauskas M, Sanders P, Threlfall EJ, Torren-Edo J, Törneke K. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. J Antimicrob Chemoth 2011b, 66: 2705-14 b.

van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. J Clin Microbiol 2010, 48: 900.

Veloo ACM, de Vries ED, Jean-Pierre H, Justesen US, Morris T, Urban E, Wybo I, van Winkelhoff AJ. The optimization and validation of the Biotyper MALDI-TOF MS database for the identification of Gram-positive anaerobic cocci. Clin Microbiol Infec 2016, 22: 793-8.

Walker J, Fox AJ, Edwards-Jones V, Gordon DB. Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. J Microbiol Methods 2002, 48: 117-26.

Weese JS, van Duijkeren E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. Vet Microbiol 2010, 140: 418-29.

Windahl U, Gren J, Holst BS, Börjesson S. Colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in multi-dog households: A longitudinal study using whole genome sequencing. Vet Microbiol 2016, 189: 8-14.

Wolters M, Rohde H, Maier T, Belmar-Campos C, Franke G, Scherpe S, Aepfelbacher M, Christner M. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. Int J Med Microbiol 2010, 301: 64-8.

Wu MT, Burnham CA, Westblade LF, Dien Bard J, Lawhon SD, Wallace MA, Stanley T, Burd E, Hindler J, Humphries RM. Evaluation of Oxacillin and Cefoxitin Disk and MIC Breakpoints for Prediction of Methicillin Resistance in Human and Veterinary Isolates of *Staphylococcus intermedius* Group. J Clin Microbiol 2016. 54: 535.

